Pufferkapazität und Pflanzensäfte

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Philosophischen Fakultät

der

Universität Basel

vorgelegt von

Franz Leuthardt
aus Arlesheim (Baselland)

DRESDEN und LEIPZIG 1927
Theodor Steinkopff, Verlagsbuchhandlung

Genehmigt von der mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung der philosophischen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. K. Spiro und Dr. G. Senn.

Basel, den 15. Februar 1927.

Fr. Fichter, Dekan.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus Kolloidchemische Beihefte Bd. XXV, Heft 1—4.

Meinem lieben Vater gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545822_0036

Während wir durch eine große Anzahl von Analysen die elementare Zusammensetzung der als Nahrungs- und Genußmittel dienenden tierischen und pflanzlichen Stoffe einigermaßen überblicken, sind wir über deren Aufbau im einzelnen noch längst nicht ausreichend unterrichtet.

Gerade von pflanzlichen Organen existieren z. B. eine große Anzahl von Aschenanalysen. Bei deren Benutzung ist jedoch zu bedenken, daß ein Teil der Aschenbestandteile bei der Veraschung erst entsteht, z. B. Sulfate und Phosphate aus organisch gebundenem Schwefel und Phosphor. Hier können wir nun hoffen, durch Anwendung speziell der modernen physikalisch-chemischen Methoden unsere Kenntnis des ursprünglichen Zustandes zu vermehren und so das Gleichgewicht kennenzulernen, das tatsächlich in den lebenden Geweben besteht.

Das Hauptinteresse hat sich in den letzten Jahren der Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration zugewandt, da für deren Bestimmung bequeme Methoden zur Verfügung stehen. Eine Reihe von Erfahrungen, die in der Physiologie gesammelt worden sind, haben gezeigt, daß die aktuelle Wasserstoffionenkonzentration das Resultat regulatorischer Vorgänge ist. Für das Verständnis der biologischen Vorgänge ist aber gerade die Kenntnis dieser regulatorischen Vorgänge von besonderer Bedeutung.

Von diesem Standpunkt aus wurde, wie weiter unten darzulegen sein wird, zum Teil im Anschluß an andere Arbeiten des hiesigen physiologisch-chemischen Instituts, speziell die Frage nach der Pufferung und Pufferkapazität pflanzlicher Flüssigkeiten in Angriff genommen, weil die Aussicht besteht, damit einen Einblick in jene regulatorischen Vorgänge zu gewinnen.

Da jedoch über den Begriff der Pufferung Divergenzen in der Literatur bestehen, handelte es sich zunächst darum, hierüber durch möglichst

strenge Definition präzise Begriffe zu bilden. Somit gliedert sich die folgende Arbeit in zwei Teile: einen theoretisch-physikalischen und einen experimentellen.

Allgemeiner Teil.

Eine genauere Untersuchung biologischer Flüssigkeiten, insbesondere des Blutes lehrt, daß diese in den meisten Fällen die Fähigkeit besitzen, ihre Wasserstoffionenkonzentration bei Säure- oder Laugenzugabe angenähert konstant zu halten. In reinem Wasser ändert sich die Konzentration der Wasserstoffionen bei Zugabe eines Tropfens starker Säure um mehrere Zehnerpotenzen, im Blute wird sie dadurch höchstens verdoppelt. Um das Verhalten einer Lösung in bezug auf das Wasserstoffion zu charakterisieren, genügt also die Angabe ihrer Wasserstoffionenkonzentration nicht. Man muß noch eine Größe einführen, die den „Widerstand" mißt, den die Lösung einer Veränderung der Konzentration entgegensetzt. Dieser Widerstand wird als „Pufferung" oder „Moderation" bezeichnet.

Oft ist es nützlich, noch einen dritten Begriff einzuführen, wie das folgende Beispiel zeigt.

In den meisten Pufferlösungen kommt die Pufferung dadurch zustande, daß sie das Gemisch einer schwachen Säure mit ihrem Alkalisalz enthalten. Es zeigt sich nun, daß die Wasserstoffionenkonzentration einer solchen Lösung in erster Annäherung nur vom Verhältnis von Säure und Salz, nicht aber von deren absoluter Konzentration abhängt. Moser (1926) hat nun folgenden Versuch angestellt:

Er stellte sich eine Reihe von Pufferlösungen (Phosphatgemische) her. Der Gehalt an Phosphaten war ein verschiedener, die Konzentration an Wasserstoffionen dieselbe. Sie war so gewählt, daß sie geringer war als die optimale zur Vergärung des Zuckers durch Hefe. Benützte er nun diese Lösungen zur Kultur von Hefe, so zeigte sich das folgende: In den Kulturen mit wenig Phosphat verlief die Gärung normal. Mit steigender Konzentration nahm sie ab und hörte schließlich ganz auf.

Die Erklärung des Versuches ist einfach. Ist nur wenig Phosphat vorhanden, so vermag die Hefe durch ihre Kohlensäureproduktion die Wasserstoffionenkonzentration der Kulturflüssigkeit soweit zu erhöhen, bis sie optimal wird. Ist hingegen viel Phosphat vorhanden, so reicht die produzierte Kohlensäure dazu nicht aus. Die Gärung ist also gehemmt oder ganz verhindert.

Es gibt also Fälle, in denen der Gehalt einer Lösung an Puffersubstanz oder ihre „Pufferkapazität" eine Rolle spielt. Dieser Begriff läßt sich viel allgemeiner fassen. Wir werden weiter unten zeigen, daß er auch dann noch anwendbar ist, wenn wir über den Mechanismus der Pufferung gar nichts aussagen können, die obige Definition als Gehalt an Puffersubstanz also gar keinen Sinn hat.

Es handelt sich nun darum, diese Begriffe mathematisch zu formulieren.

Als erste haben dies Koppel und Spiro (1914) getan. Ihre Arbeit enthält schon alle wesentlichen Resultate. Später haben van Slyke (1922) und Michaelis (1922) eine etwas andere Definition der Pufferung gegeben. Täufel und Wagner (1920) haben besonders heterogene Systeme behandelt. Wir werden an gegebener Stelle auf ihre Arbeiten zurückkommen.

Der Begriff der Pufferung ist entstanden durch die Beobachtung, daß in vielen Lösungen bei Säure- oder Laugenzusatz die Konzentration der Wasserstoffionen sich viel weniger verändert als in reinem Wasser. Man nannte alle diese Lösungen im Gegensatz zum Wasser „gepuffert". Wir werden deshalb bei der Definition der Pufferung von der Tatsache ausgehen, daß chemisch reines Wasser nicht gepuffert ist. Der mathematische Ausdruck für die Pufferung soll so gewählt werden, daß er für Wasser identisch verschwindet.

Um einen zahlenmäßigen Ausdruck für die Pufferung zu gewinnen, versetzen wir die vorliegende Lösung mit steigenden Mengen einer Säure (Base) und tragen die Konzentration der Säure in der Lösung als Ordinate, die Konzentration der Wasserstoffionen (Hydroxylionen) als Abszisse in ein kartesisches Koordinatensystem ein. Wir erhalten so die „Titrationskurve" der Lösung. Vergleichen wir jetzt die Kurven zweier Lösungen, die verschieden stark gepuffert sind, so finden wir, daß die Kurve der stärker gepufferten Lösung steiler gegen die Abszissenachse verläuft als die Kurve der schwächer gepufferten; denn um die gleiche Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration hervorzurufen, ist bei der ersteren ein größerer Säurezusatz nötig als bei der letzteren. Die Steilheit der Kurve ist also ein Maß für die Pufferung. Denken wir uns die Titrationskurve analytisch gegeben durch die Gleichung

$$S = S(h),$$

wo S die Konzentration der Säure, h die Konzentration der Wasserstoffionen bedeutet, so könnte die Größe $\frac{dS}{dh}$ als Maß für die Pufferung

gelten. Wir haben aber vorhin gefordert, daß der Ausdruck, auf das Wasser angewandt, identisch verschwinden soll. Das wäre nur möglich, wenn die Titrationskurve des Wassers eine Gerade wäre, die parallel zur Abszissenachse läuft. Eine solche Titrationskurve aber hat physikalisch keinen Sinn. Die wirkliche Titrationskurve des Wassers hat überall eine endliche Neigung gegen die Abszissenachse. Man gelangt aber sofort zu einem Ausdruck, der die geforderte Eigenschaft besitzt, wenn man als Maß für die Pufferung die Differenz nimmt zwischen der Neigung der Titrationskurve des Wassers und derjenigen der Lösung. Ist also die erstere gegeben durch die Gleichung

$$S_0 = S_0 (h),$$

so nehmen wir den Ausdruck

$$P = \frac{dS}{dh} - \frac{dS_0}{dh} = \frac{d(S - S_0)}{dh}$$

als Maß für die Pufferung.

Man kann den Zahlenwert der Pufferung leicht graphisch ermitteln, indem man in dasselbe Koordinatensystem die Titrationskurven des Wassers und der Lösung einträgt, die Differenz der Ordinaten nimmt und die Neigung der auf diese Weise entstehenden Kurve bestimmt.

Für die Titrationskurve des Wassers läßt sich eine Gleichung angeben, welche die empirische Kurve gut wiedergibt. Bezeichnet man mit α den Dissoziationsgrad der Säure, so gilt

$$S_0 = \frac{h}{\alpha}.$$

Anderseits berechnet sich α aus dem Massenwirkungsgesetz zu

$$\alpha = \frac{k}{k+h},$$

wo k die Dissoziationskonstante der Säure ist. Man hat also zwischen S_0 und h die Beziehung

$$S_0 = h \cdot \frac{h+k}{k}.$$

Der Ausdruck für die Pufferung wird also

$$P = \frac{dS}{dh} - \left(\frac{2h}{k} + 1\right).$$

Liegt eine starke Säure vor, z. B. Salzsäure, so kann deren Dissoziationsgrad gleich eins gesetzt werden. D. h., k wird unendlich groß und die Gleichung geht über in

$$P = \frac{dS}{dh} - 1.$$

Das ist derselbe Ausdruck, wie ihn Koppel und Spiro angegeben haben.

Die Wasserstoffionenkonzentrationen, mit welchen der Biologe es zu tun hat, sind meist sehr klein. Sie bewegen sich etwa zwischen den Werten 10^{-3} und 10^{-11}. Sörensen (1909) hat deshalb vorgeschlagen, statt der Zahlen selbst deren positiv genommene Exponenten zu verwenden. Es ist gebräuchlich, diese Exponenten als „p_H" zu bezeichnen. (In den Formeln schreiben wir immer bloß p.) Die Wasserstoffionenkonzentration h und der Wasserstoffexponent p sind also verknüpft durch die Beziehung:

$$p = -\log h.$$

Die Einführung des Wasserstoffexponenten bietet gewaltige Vorteile für die graphische Darstellung. In den Lösungen, die nicht extrem sauer oder alkalisch sind, ist die Wasserstoffionenkonzentration absolut genommen sehr klein, und es treten leicht Verschiebungen ein, die das Zehntausend- und Hunderttausendfache des ursprünglichen Wertes betragen. Eine graphische Darstellung solcher Größenunterschiede ist praktisch unmöglich. Die Verhältnisse können aber leicht anschaulich gemacht werden, wenn man an Stelle des Numerus den Logarithmus, d. h. den Wasserstoffexponenten verwendet. Es bietet dies ähnliche Vorteile wie das logarithmische Rechnen gegenüber dem Rechnen mit den Zahlen selbst. Zudem drücken sich bei Einführung des p als Variabler verschiedene Eigenschaften der Lösungen in hervorstechender Weise im Kurvenbild aus, was nicht der Fall ist, wenn man die Konzentration selbst verwendet. Wir werden von diesen Eigenschaften der Kurven noch weitgehend Gebrauch machen.

Man darf aber nie vergessen, daß zwischen den beiden Darstellungsarten ein prinzipieller Unterschied besteht. Im einen Fall betrachtet man Differenzen von Konzentrationen, im anderen Fall aber Verhältnisse. Darin liegen nun die Nachteile des Wasserstoffexponenten, die freilich mehr subjektiver Natur sind. Durch Nichtbeachtung seiner logarithmischen Natur entstehen leichter Irrtümer und falsche Vorstellungen. Einige der wichtigsten seien hier genannt.

1. Man ist leicht geneigt, eine bestimmte Verschiebung des p_H z. B. eine Verschiebung um die Einheit, als gleichwertig anzusehen, gleichgültig, ob sie von zwei auf drei oder von sechs auf sieben geht. Absolut genommen beträgt aber die Verschiebung im ersten Falle 0,09, also fast ein hundertstel Mol, im zweiten Falle aber 0,000 009, also etwas weniger als ein milliontel Mol.

2. Führt man in den Ausdruck, der oben für die Pufferung abgeleitet worden ist, an Stelle des h das p ein und wendet ihn auf das Gemisch einer schwachen Säure mit ihrem Salz an, so findet man, daß

für gleiche Konzentration von Säure und Salz die Pufferung ein Maximum besitzt. Man wird also erwarten, daß bei diesem Mischungsverhältnis die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration bei einem bestimmten Säurezusatz den kleinstmöglichen Wert hat. Das ist aber durchaus nicht der Fall. Sie ist absolut gemessen am kleinsten, wenn eine reine Lösung des Salzes vorliegt. Sobald man einen Teil des Salzes durch die freie Säure ersetzt, ist sie größer.

Aus den Formeln folgt des weiteren, daß bei gegebenem Mischungsverhältnis der Wert der Pufferung unabhängig ist von der Dissoziationskonstante. Es würden also z. B. Oxalsäure, Apfelsäure, Essigsäure gleich gut puffern. Auch das ist nicht richtig. Je schwächer die Säure, desto geringer ist beim gleichen Säurezusatz die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration, desto besser also die Pufferung.

Man kann nun freilich einwenden, daß man mit demselben Recht den einen oder anderen Ausdruck als Maß für die Pufferung wählen kann. Das ist richtig, nur muß man sich bei Wahl des p_H vor Augen halten, daß man zu einer logarithmischen Skala übergeht und daß gewisse Eigenschaften der Kurven (Extremwerte, Wendepunkte) keine unmittelbare physikalische Bedeutung zu haben brauchen.

Führt man das p in die obigen Formeln ein, so nehmen sie folgende Gestalt an:

$$\frac{dS}{dp} = -\frac{dS}{d10^{-p}} \cdot 10^{-p} \cdot \ln 10$$

$$\frac{dS_0}{dp} = -\left(\frac{2 \cdot 10^{-p}}{k} + -1\right) 10^{-p} \ln 10$$

$$P = -10^{-p} \cdot \ln 10 \left(\frac{dS}{d10^{-p}} - \frac{2 \cdot 10^{-p}}{k} - 1\right)$$

Setzt man $k = \infty$, d. h. beschränkt man sich auf total dissoziierte Säuren, so geht der letzte Ausdruck über in

$$P = -\left(\frac{dS}{d10^{-p}} - 1\right) 10^{-p} \cdot \ln 10,$$

wie schon von Koppel und Spiro angegeben.

Van Slyke (und ebenso Michaelis) nimmt als Maß für die Pufferung einfach die Größe $\frac{dS}{dp}$. Durch diese Wahl ist er gezwungen, auch dem Wasser eine Pufferung zuzuschreiben, die bedingt ist durch den Verlauf der Titrationskurve (siehe van Slyke loc. cit. S. 533). Bei einer starken Säure ist die Konzentration der Wasserstoffionen gleich der Konzentration der zugesetzten Säure, also

$$S = h = 10^{-p}$$

$$P = \frac{dS}{dp} = 10^{-p} \cdot \ln 10.$$

Die Pufferung des Wassers wird praktisch verschwindend klein für Werte von p zwischen 3 und 11. Es ist in diesem Gebiet also praktisch gleichgültig, ob man die hier gegebene oder die van Slykesche Definition anwendet.

Folgendes sind die Gründe, warum ich nicht an dieser einfacheren Definition festgehallten habe:

Der ursprüngliche Inhalt des Begriffes der gepufferten Lösung ist doch sicher der, daß sich diese Lösung durch ihr Verhalten gegenüber Säuren oder Basen auf bestimmte Weise vom reinen Wasser unterscheidet. Wir sind gewohnt, wenn wir von Pufferung sprechen, einen chemischen Mechanismus anzunehmen, der diese Pufferung bewirkt (z. B. das Gemisch einer schwachen Säure mit ihrem Alkalisalz). Die Pufferung ist also eine Eigenschaft, welche alle diejenigen Lösungen charakterisiert, die einen solchen Mechanismus enthalten. Es hat keinen Sinn, von Pufferung zu reden, wo ein solcher nicht vorhanden ist.

Bei van Slyke hingegen wird die Pufferung zu einer allgemeinen Eigenschaft der Lösungen, ähnlich wie Dichte oder Absorptionsvermögen. So gut wie jeder Lösung eine bestimmte Dichte oder Farbe zukommt, kommt ihr auch eine bestimmte Pufferung zu. Ich habe es vorgezogen, am ursprünglichen Begriffe festzuhalten, weil sein Wert gerade darin liegt, daß er eine bestimmte Art von Lösungen, nämlich die „Pufferlösungen" oder „Moderatoren" charakterisiert. Auch bei der van Slykeschen Fassung kommt natürlich ein Unterschied heraus zwischen Moderatoren und Nichtmoderatoren, indem bei den letzteren die Pufferung ganz bestimmte Zahlenwerte annimmt. Der Unterschied ist aber bloß ein quantitativer. Die hier gegebene Fassung hingegen unterscheidet prinzipiell die beiden Arten von Lösungen.

Dieselben Überlegungen lassen sich für Basen anstellen. Bezeichnen wir mit l die Konzentration der Hydroxylionen, mit L die Konzentration der Lauge, mit k deren Dissoziationskonstante, so lautet der entsprechende Ausdruck

$$P = \frac{dL}{dl} - \frac{2l}{k} - 1.$$

Für total dissoziierte Basen reduziert er sich auf

$$P = \frac{dL}{dl} - 1.$$

Die Ausdrücke für total dissoziierte Säuren und Basen haben die Eigenschaft, daß sie das Vorzeichen nicht wechseln. Nach Voraussetzung ist immer $\frac{dS}{dh} > \frac{2h}{k} - 1$, d. h. die Titrationskurve der Lösung

verläuft steiler gegen die Abszissenachse als die Titrationskurve des Wassers. Ein Zeichenwechsel kann nun nicht anders eintreten, als wenn $\frac{dS}{dh} < \frac{2h}{k} - 1$ wird. Es müßte also in reinem Wasser die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration bei gleichem Säurezusatz geringer sein als in der gepufferten Lösung. Da wir aber annehmen, daß die Dissoziation der Säure in Wasser total sei, ist dies unmöglich. Dasselbe gilt für die Ausdrücke mit p, denn der Faktor $10^{-p} \ln 10$ ist immer positiv.

Für schwache wenig dissoziierte Säuren gilt diese Überlegung nicht. Es ist denkbar, daß die schwache Säure mit einem Körper in der Pufferlösung unter Bildung einer stärker dissoziierenden Verbindung reagiert, oder daß sie selbst aus irgendeinem Grunde in der Pufferlösung stärker dissoziiert. In diesem Falle ist die Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration in der gepufferten Lösung größer als in der nicht gepufferten. Der Ausdruck für die Pufferung wird also negativ. Es gibt zahlreiche Beispiele dafür, daß die Dissoziation von Elektrolyten, insbesondere von Säuren, durch Nichtelektrolyte beeinflußt werden kann. Wir werden im speziellen Teil zeigen, daß z. B. Gemische von Zitronensäure, Apfelsäure, Weinsäure mit ihren Alkalisalzen durch Zusatz von Glukose beträchtlich sauer werden. Ähnliche Erscheinungen sind schon längere Zeit bekannt. Loeffler und Spiro (1919) haben den Einfluß verschiedener Zusätze, Alkohol, Glukose und besonders Glyzerin, auf Puffergemische untersucht (Phosphat-, Borat-, Zitrat-, Glykokollgemische) und stets gefunden, daß die Lösungen saurer werden.

Es fragt sich, wie diese Verstärkung des Säurecharakters zustande kommt. Die genannten Autoren machen darauf aufmerksam, daß wir uns von der Wirkung der Nichtelektrolyte ein Bild machen können, wenn wir die moderne Strukturlehre der anorganischen Chemie zu Hilfe nehmen. Die mutmaßliche Struktur der Heteropolysäuren liefert uns Beispiele dafür, daß in das Säuremolekül neue Gruppen eintreten können, welche seinen Säurecharakter verstärken. Solchen anorganischen Modellen entsprechend kann man sich nun die Verbindungen des Glyzerins oder der Glukose mit den genannten Säuren vorstellen. Verbindungen der Phosphorsäure und Borsäure mit organischen Körpern (Alkoholen) sind bekannt. Es gehören hierher die Glyzerinphosphorsäure, ferner die bei Gärungserscheinungen auftretenden Verbindungen der Glukose mit Phosphorsäure. Besser entsprechen vielleicht noch die komplexen Verbindungen der Borsäure mit Glyzerin oder Mannit den genannten anorganischen Modellen. Die Eigenschaft dieser Verbindungen, stärkere Säuren zu sein als die Borsäure selbst, benutzt man bekanntlich zur

Titration der letzteren. Es ist nun sehr wohl möglich, daß auch organische Säuren derartige Komplexe zu bilden imstande sind unter Verstärkung ihres elektronegativen Charakters. Alle diese Erscheinungen können freilich nicht als Beispiele „negativer Pufferung" gelten, denn es handelt sich in keinem Falle um die Erhöhung der Azidität einer reinen Säure, sondern eines Gemisches der Säure mit ihrem Alkalisalze. In reiner Säurelösung läßt sich auch bei starker Verdünnung durch Glukosezusatz keine nennenswerte Verschiebung der Azidität beobachten. Es scheint also, daß für das Zustandekommen des Effektes die Anwesenheit von Alkali durchaus notwendig ist. Hieraus ergibt sich aber eine weitere Möglichkeit der Erklärung. Man kann annehmen, daß die Nichtelektrolyte nicht auf die Säure selbst, sondern auf das Alkali einwirken, indem sie es vielleicht in nicht ionogener Form binden. Wir können uns von dieser Bindung freilich keine so exakte Vorstellung machen wie im Fall der Säuren. Sie müßte in Puffergemischen natürlich denselben Effekt hervorrufen wie eine Verstärkung des elektronegativen Charakters der Säure, nämlich eine Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration. Ich konnte nun durch Titration von Glukose- und Saccharoselösungen mit Natronlauge zeigen, daß diese Zucker tatsächlich imstande sind, ganz beträchtliche Mengen Lauge zu binden. Die Wirkung zeigte sich, da keine Säure zugegen war, naturgemäß bei alkalischer Reaktion. Das schließt aber nicht aus, daß eine Bindung auch bei saurer Reaktion stattfindet, wenn sich auch in diesem Falle nicht auseinanderhalten läßt, ob die Erhöhung der Azidität durch Einwirkung der Nichtelektrolyte auf das Alkali oder auf die Säure zustande kommt. (Wir kommen auf die betreffenden Versuche im speziellen Teil der Arbeit nochmals zurück.) Ich kann hier auf diese Fragen nicht weiter eingehen, sondern muß ihre Behandlung einer späteren Arbeit vorbehalten. Sichere Beispiele für die „negative Pufferung" in homogenen Systemen sind den bisherigen Erfahrungen nicht zu entnehmen. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß es noch gelingt, solche aufzufinden, besonders wenn sich die Auffassung Loefflers und Spiros (Komplexbildung) als richtig erweist.

Wir wollen noch kurz die Frage streifen, inwieweit sich die hier gegebene Formulierung der Pufferung auf nichtwässerige Lösungsmittel anwenden läßt.

Es gibt hier zwei Möglichkeiten:

1. Man vergleicht auch hier die Titrationskurve der Lösung mit der Titrationskurve des Wassers.

2. Man vergleicht die Titrationskurve der Lösung mit der Kurve

des reinen Lösungsmittels. (Ob die Titration praktisch durchführbar ist, lassen wir hier außer acht.)

Im zweiten Falle dürfte die Feststellung dessen, was als Lösungsmittel zu bezeichnen ist, oft schwierig sein und nicht ohne Willkür geschehen können. Nehmen wir z. B. an, wir titrieren das Gemisch von 1 Teil Eisessig, 1 Teil absolutem Alkohol und 1 Teil Wasser. Welches ist hier das Lösungsmittel? Soll man die Titrationskurve des Gemisches vergleichen mit der Titrationskurve des Wassers allein oder einer Mischung von gleichen Teilen Alkohol und Wasser? Die Frage ist nicht ohne Willkür zu entscheiden. Ich halte es für das geeignete, in jedem Falle mit dem Wasser zu vergleichen, auch dann, wenn die Lösung überhaupt kein Wasser enthält, denn als Maßstab für die Dissoziation der Säuren und Basen gilt immer ihr Verhalten in wässeriger Lösung. Wenn wir ihre Dissoziation in anderen Lösungsmitteln untersuchen, so interessiert uns vor allem, inwiefern sie von der „normalen" Dissoziation in Wasser abweicht.

Der Ausdruck für die Pufferung bleibt also für alle Lösungsmittel derselbe.

Auch für nichtwässerige Lösungsmittel könnte der Fall negativer Pufferung eintreten, nämlich dann, wenn die Säure im betreffenden Lösungsmittel stärker dissoziiert als in Wasser. Beispiele sind aber auch hier meines Wissens keine bekannt geworden.

Es ist also möglich, für jede Lösung den Zahlenwert derPufferung festzustellen, ohne daß man ihren speziellen Mechanismus kennt. Man muß nur mit Hilfe geeigneter Methoden ihre Wasserstoffionenkonzentration messen können. Die Analyse der Titrationskurven gestattet aber, gewisse Schlüsse auf die Natur des vorliegenden Puffersystems zu ziehen. Wir wollen deshalb die wichtigsten Puffersysteme und ihre Titrationskurven kurz besprechen.

Ganz allgemein wirkt jeder Stoff als Puffer, welcher Säuren oder Basen zu binden imstande ist. Im allgemeinen entsteht dabei eine Verbindung von weniger saurem oder weniger alkalischem Charakter als die ursprüngliche Säure oder Base, z. B. ein Salz. Es ist aber auch möglich, daß die Lösung saurer oder alkalischer wird. Das ist z. B. der Fall, wenn sich in der Lösung das Salz einer starken Säure befindet, deren Kation mit der hinzugefügten schwachen Säure ein schwerlösliches Salz bildet. Dieses fällt aus, und in der Lösung bleibt die freie starke Säure zurück (Weinsäure und Kaliumchlorid). Auch eine Verstärkung der Dissoziation der hinzugefügten Säure wirkt in diesem Sinne (Apfelsäure in Glukoselösung).

Man kann also ganz allgemein die Puffer als solche Stoffe oder Systeme definieren, welche den Charakter der zugegebenen Säuren oder Basen zu ändern imstande sind, gleichgültig, ob sie mit ihnen neue Verbindungen eingehen oder ob sie einfach ihre Dissoziation verändern.

In weitaus den meisten Fällen beruht die Pufferung auf einer Salzbildung. Die wirksamste Pufferlösung für eine Säure ist also die Lösung einer Base, und umgekehrt. Ein solcher Puffer wirkt aber immer nur in einem Sinne, d. h. eine Lauge puffert zwar gegen eine Säure, nicht aber gegen eine andere Lauge. Ein System, das sowohl gegen Säuren als auch gegen Basen puffert, erhält man durch Mischung einer schwachen Säure mit ihrem Salz. Seine Wirkungsweise ist folgende:

a) Eine Basis wird neutralisiert. Solange die Lösung freie Säure enthält, ist die Wirkung sehr stark. Die Vermehrung der Hydroxylionen kommt einzig zustande durch die Abnahme der Wasserstoffionen (Neutralisation der freien Säure) sowie durch die Hydrolyse des entstehenden Salzes.

b) Eine starke Säure tritt an Stelle der Puffersäure in das Salz ein. Statt ihrer enthält die Lösung die wenig dissoziierte Puffersäure. Hier ist die Wirkung gut, solange noch das Salz der letzteren vorhanden ist.

c) Gegen schwache Säuren ist die Wirkung dieselbe. Die Puffersäure wird durch die zugesetzte Säure teilweise aus ihrem Salz verdrängt, je nach ihrer Stärke.

d) Für die Wirkung gegen die Puffersäure selbst kommt nur das Salz in Betracht. Dadurch nämlich, daß das Anion der Säure schon in der Lösung vorhanden ist, wird die Dissoziation der zugefügten Säure stark zurückgedrängt.

Pufferwirkung kann ferner zustande kommen durch Adsorption der Wasserstoff- oder Hydroxylionen. Löffler und Spiro (1919) z. B. haben gezeigt, daß man durch Schütteln mit Kohle saure und alkalische Lösungen dem Neutralpunkte näher bringen kann. Auch bei der Pufferung in kolloiden Systemen dürfte die Adsorption eine Rolle spielen. Da aber die meisten Kolloide selbst schwache Säuren oder Basen sind, ist schwer zu entscheiden, inwieweit die Pufferwirkung rein auf Adsorption beruht.

Bei Säuren ist auch eine Pufferwirkung durch Anhydridbildung denkbar. Es ist z. B. bekannt, daß bei der Milchsäure ein Gleichgewicht besteht zwischen der freien Säure und der Lactylform (Eder und Kutter 1926). Setzt man zu einem solchen System freie Milchsäure hinzu, so muß ein Teil davon in die Lactylform übergehen, also teilweise neutralisiert werden. Die Einstellung des Gleichgewichtes geht freilich

in diesem Falle außerordentlich langsam vonstatten. Die Vermutung, daß solche Anhydridbildung in der Natur eine Rolle spielen könnte, ist in der Literatur schon geäußert worden. Franzen und Ostertag (1922) fanden bei Crassulaceen das Malylapfelsäuredianhydrid und messen diesem Vorkommen Bedeutung bei für die Entsäuerung der Pflanze. Es ist möglich, daß Pflanzen mit so starker Säureproduktion wie die Crassulaceen ihre Azidität auf diese Weise regulieren können, doch sind weiter keine Tatsachen bekannt, die dafür sprechen würden.

Wir wollen nun die einzelnen Fälle soweit als möglich rechnerisch behandeln.

Gemisch einer einbasischen schwachen Säure mit ihrem Salz. Eine Lösung enthält pro Volumeneinheit s Mol einer einbasischen schwachen Säure mit der Dissoziationskonstante k. Wir bringen dazu pro Volumeneinheit b Mol einer starken Lauge, die wir als total dissoziiert annehmen. Die Konzentration des Säureanions soll a betragen. Zur Berechnung der Wasserstoffionenkonzentration h eines solchen Gemisches dienen die folgenden Gleichungen:

$$h \cdot a = k\,(s - a)$$
$$h \cdot l = k_w$$
$$h + b = a + l.$$

k_w ist die Dissoziationskonstante des Wassers.

Die beiden ersten Gleichungen folgen aus dem Massenwirkungsgesetz, die letzte aus der Forderung der elektrischen Neutralität der Lösung.

Aus diesen Gleichungen folgt h als Wurzel einer kubischen Gleichung:

$$h + b = \frac{k_w}{h} + s \cdot \frac{k}{k + h}.$$

Vernachlässigt man hier die Größen h und $\frac{k_w}{h}$ (die Konzentration der Wasserstoff- und Hydroxylionen) gegenüber den andern Gliedern, so folgt aus der Gleichung sofort die bekannte Hendersonsche Formel

$$h = k \frac{s - b}{b}$$

Die Vernachlässigung gibt praktisch keinen Fehler für Werte von h, welche zwischen 10^{-3} und 10^{-11} liegen.

Wir stellen nun die Veränderungen fest, welche in diesem System durch Hinzufügen einer starken, total dissoziierten Säure hervorgerufen werden. Bringen wir S Mol pro Volumeneinheit hinzu, so ist die einzige Wirkung die, daß ebensoviele Mol Puffersäure aus ihrem Salz ausgetrieben

werden. Die Konzentration des Puffersalzes wird also um S vermindert, und die obige Gleichung geht über in

$$h + b - S = \frac{k_w}{h} + s\,\frac{k}{k+h}.$$

Trägt man nun h als die Abszisse, S als Ordinate in ein kartesisches Koordinatensystem ein, so folgt als Gleichung der Titrationskurve:

$$S = h + b - \frac{k_w}{h} - s\,\frac{k}{k+h}.$$

Für eine starke Säure ist $S_0 = h$. Man findet also

$$S - S_0 = b - \frac{k_w}{S} - s\,\frac{k}{k+h}.$$

Für Werte von h, welche größer sind als etwa 10^{-11} (das trifft für die gebräuchlichen Puffergemische stets zu) kann, man das Glied $\frac{k_w}{h}$ vernachlässigen und findet

$$S - S_0 = b - s\,\frac{k}{k+h} = b - \frac{k}{k+10^{-p}}$$

$$P = \frac{S \cdot k}{(k+h)^2}$$

oder

$$P = \frac{-s \cdot k}{(k+10^{-p})^2}\,10^{-p} \cdot \ln 10$$

Fügt man zum selben System total dissoziierte Lauge hinzu, L Mol pro Volumeneinheit, so wird das Puffersalz um ebensoviele Mol vermehrt. Die Gleichung geht über in

$$h + b + L = \frac{k_w}{h} + s \cdot \frac{k}{k+h}.$$

Es ist nun gebräuchlich, den Laugenzusatz in Richtung der negativen Ordinatenachse aufzutragen. Die Gleichung der Titrationskurve ist daher dieselbe wie vorhin

$$L = h + b - \frac{k_w}{h} - s \cdot \frac{k}{k+h}.$$

Man kann einfach den Laugenzusatz als negativen Säurezusatz betrachten. Um daraus die Pufferung zu finden, sollte man nach der oben angegebenen Definition nicht h, sondern l, d. h. die Konzentration der Hydroxylionen, als Variable nehmen und dementsprechend die Ableitung nach l bilden. Wir unterlassen das aus folgendem Grunde: Man verwendet praktisch die Gleichung nie in dieser Form, sondern nimmt immer an Stelle von h den Wasserstoffexponenten p als Variable und entsprechend statt l die Größe $-(\log k_w + p)$. Die beiden Variablen unterscheiden sich also bloß durch das Vorzeichen und durch eine addi-

tative Konstante, so daß es, abgesehen vom Vorzeichen durchaus gleichgültig ist, ob man die Ableitung nach der einen oder andern nimmt. Die Pufferung wird also

$$P = \frac{d(L - L_0)}{dP} = s \frac{k}{(k + 10^{-p})^2} \cdot 10^{-p} \cdot \ln 10.$$

Wir werden im folgenden immer p als Variable nehmen. Die Form der Kurven ist sehr charakteristisch (Fig. 6). Der mittlere steil verlaufende Ast besitzt einen Wendepunkt, der wegen folgender Eigenschaften wichtig ist (Herleitungen siehe bei Koppel und Spiro):

1. Seine Abszisse ist gleich dem negativen Logarithmus der Dissoziationskonstanten (Säureexponent) der Puffersäure. Dieser Wendepunkt ist leicht graphisch zu ermitteln. Wir können also durch Aufnahme der Titrationskurve einer Säure ihre Dissoziationskonstante bestimmen.

2. Die Neigung der Wendetangente hängt von der Konzentration des Puffergemisches ab (Konzentration von freier Säure plus Salz) und ist unabhängig vom Verhältnis der Säure zum Salz und unabhängig von der Dissoziationskonstanten der Säure. Die Tangente des Neigungswinkels ist proportional der Konzentration des Puffergemisches, nämlich 0,575 s.

3. Die Ordinate des Wendepunktes hängt ab vom Salzgehalt des Gemisches. Sie mißt b — s.

Ein besonderes Charakteristikum der Titrationskurven ist der sogenannte „p_H-Sprung". Erfahrungsgemäß wird das Ende einer elektrometrischen Titration dadurch angezeigt, daß das p_H bei geringem Laugenzusatz oder Säurezusatz sich sprunghaft ändert, d. h. die Titrationskurve biegt ab und verläuft beinahe der p-Achse parallel. Nehmen wir als Beispiel eine Titration mit Lauge, so ist die bis dahin verbrauchte Lauge äquivalent der freien Puffersäure und wird im Kurvenbild dargestellt durch den Abstand dieses horizontalen Kurvenastes von der p-Achse.

Dasselbe folgt aus der mathematischen Analyse der Titrationskurve. Beschränken wir uns auf einen p_H-Bereich, für welchen die Konzentration der Wasserstoff- und Hydroxylionen vernachlässigt wird gegenüber der Konzentration der Säure und des Salzes, so kann man die Titrationskurve darstellen durch die Gleichung

$$L + b = s \frac{k}{k + h},$$

die zwar nur einen Teil der Titrationskurve richtig wiedergibt, aber gerade denjenigen, der für diese Betrachtung wichtig ist. Die Kurve, welche durch diese Gleichung dargestellt wird, hat nämlich im Abstande

— (s — b) eine zur p-Achse parallele Asymptote, an welche sie sich eng anschmiegt. Die wirkliche Titrationskurve richtet sich freilich nachher wieder auf. Dadurch aber, daß sie sich streckenweise an die Asymptote anschmiegt, kommt der oben genannte „p_H-Sprung" zustande. Der Abstand der Asymptote ist, wie man sieht, gerade gleich der molaren Konzentration der freien Säure. Wir müssen also die Aussage, wonach der Abstand des horizontalen Kurvenastes gleich der Konzentration der freien Puffersäure ist, dahin präzisieren, daß der Abstand der Asymptote uns diese Konzentration gibt; denn der Kurvenast ist streng genommen der p-Achse gar nicht parallel, sondern besitzt immer eine endliche, wenn auch kleine Neigung.

Der Wendepunkt der Titrationskurve bedingt einen Extremwert der Pufferung, in diesem Fall ein Maximum. Wir haben oben schon erwähnt, daß er rein formaler Natur ist und keine unmittelbare physikalische Bedeutung zu haben braucht.

Wir betrachten nun die Veränderungen des Säure-Salz-Gemisches, wenn wir eine schwache, nicht vollständig dissoziierte Säure hinzufügen. Der Unterschied gegenüber dem vorigen Fall ist bloß ein quantitativer. Während die starke Säure vollständig in das Salz eintritt, wird die schwache Säure nur zum Teil gebunden. Bezeichnen wir die Dissoziationskonstante der zugefügten Säure mit k', die Konzentration ihres Anions mit a', so gelten die folgenden Gleichungen:

$$h\,a = k\,(s - a)$$
$$h\,a' = k'\,(S - a')$$
$$h + b = a + a' + l$$
$$h\,l = k_w.$$

Man erhält daraus für S die folgende Gleichung

$$S = \frac{k' + 10^{-p}}{k'}\left(10^{-p} + b - \frac{k_w}{10^{-p}} - \frac{s\,k}{k + 10^{-p}}\right)$$

ferner für $S - S_0$

$$S - S_0 = \frac{10^{-p} + k'}{k'}\left(b - \frac{k_w}{10^{-p}} - \frac{s\,k}{k + 10^{-p}}\right).$$

Lassen wir dieselben Vereinfachungen zu wie oben, so gehen diese Ausdrücke über in

$$S - S_0 = \frac{10^{-p} + k'}{k'}\left(b - \frac{s\,k}{k + 10^{-p}}\right).$$

In diesem Ausdruck ist auch der Fall enthalten, daß man die Puffersäure selbst zufügt. Es wird dann $k = k'$ und somit

$$S - S_0 = \frac{10^{-p} + k}{k} \cdot b - s.$$

Die Pufferung wird in diesem Falle

$$P = b \cdot \frac{10^{-p}}{k} \ln 10.$$

Wie man sieht, hängt sie wesentlich von b, d. h. vom Gehalt der Lösung an Kationen ab. Ferner ist beim selben Kationengehalt die Pufferung um so geringer, je stärker die Säure ist.

Wir heben diesen Fall besonders hervor, weil er in der Natur weitaus der häufigste und wichtigste ist. Der Fall der Pufferung gegen starke Säuren ist für das Laboratorium von Bedeutung. Er ist wichtig, wenn es sich darum handelt, ein vorliegendes Puffergemisch zu analysieren. Der Organismus hingegen wird kaum je in den Fall kommen, sich gegen Mineralsäuren schützen zu müssen; vielmehr sind es die Puffersäuren selbst, die er in Menge hervorbringt und die eine zu starke Ansäuerung bewirken könnten.

Wir kommen nun dazu, den Begriff der Pufferkapazität genauer zu formulieren.

Dazu führt folgende Überlegung: Fügt man zu einer Pufferlösung Säure hinzu und vergleicht die Konzentrationsänderung der Wasserstoffionen mit der Änderung in Wasser beim gleichen Säurezusatz, so wird man bei genügendem Zusatz schließlich erreichen, daß die Veränderung in Lösung und Wasser dieselbe ist. Das System ist erschöpft. In einem unterscheiden sich aber Lösung und Wasser: Die Säuremenge, welche man dem Wasser zugesetzt hat, ist kleiner als die Säuremenge, die man für die Lösung gebraucht hat. Die Differenz wird um so größer sein, je größer die Pufferkapazität des Systems ist. Wir können sie also als Maß für die letztere verwenden.

Wenn das p_H in Lösung und Wasser beim selben Säurezusatz dieselbe Änderung erfährt, so laufen die beiden Titrationskurven einander parallel, d. h. ihr auf der Ordinate gemessener Abstand ist konstant. Das drückt sich analytisch darin aus, daß die Differenz $S - S_0$ einem festen Grenzwert zustrebt. Wir nehmen also als Maß für die Pufferkapazität den Grenzwert von $S - S_0$ für wachsendes h. Sie sei durch den Buchstaben K_s bezeichnet.

Entsprechendes gilt für Laugen. Hier nehmen wir die Differenz $L - L_0$. Wir nennen sie K_L.

Für die verschiedenen oben behandelten Fälle finden wir die Werte wie folgt:

1. Starke Säuren

$$S - S_0 = b - \frac{sk}{k+h}$$

$$K_s = b.$$

2. Schwache Säuren

$$S - S_0 = \frac{k' + h}{k'} \left(b - s \cdot \frac{k}{k + h} \right)$$

$$K_s = \infty.$$

3. Puffersäure

$$S - S_0 = \frac{k + h}{k} b - s$$

$$K_s = \infty.$$

4. Starke Basis

$$L - L_0 = l - \frac{s \cdot k \cdot l}{k_s l + k_w}$$

$$K_L = b - S.$$

Wie man sieht, ist es nicht möglich, durch Zugabe von schwacher Säure ein Puffergemisch zu erschöpfen, es bedarf dazu einer Mineralsäure.

In der Anwendung von besonderer Wichtigkeit sind der erste und der letzte Fall. Wie man sieht, ist die Summe der absoluten Werte von K_s und K_L eine Konstante.

$$K_s + | K_L = S,$$

also gleich der Gesamtkonzentration des Puffergemisches. Durch Zufügen von Säure zu einem Puffergemisch vermindert man daher dessen Säurekapazität, erhöht aber seine Laugenkapazität und umgekehrt.

Wir haben bei den bisherigen Rechnungen immer vorausgesetzt, daß das Volumen der Lösung und damit die Konzentration des Puffers durch die Säurezugabe nicht geändert werde. Bei praktischen Versuchen ist das nie der Fall, da wir die Säure nicht anders als in Form einer Lösung zugeben können. Die Puffersubstanz wird also verdünnt, und die Pufferung ist kleiner als die berechnete. (Genauere Rechnungen findet man bei Auerbach und Smolczyk, Zur Theorie und Praxis der elektrometrischen Säuretitration, Zeitschr. f. physik. Chem. **110**, 65 [1924].)

Dasselbe Gemisch kann also, je nach der Art der Titration, ganz verschiedene Titrationskurven zeigen. Soll die Titrationskurve also ein bestimmtes Gemisch charakterisieren, so muß man darauf achten, daß während der Titration die Konzentration der Puffersubstanz konstant bleibt.

Wir dürfen wohl annehmen, daß auch im Organismus die Zufuhr der Säuren ohne große Volumenänderung geschieht. (Diffusion, Entstehung an Ort und Stelle.)

Es seien anhangsweise noch einige Anwendungen behandelt, die für den praktischen Teil von Wichtigkeit sind.

Mehrbasische Säuren. Eine Lösung, die eine n-basische Säure enthält, kann gleich behandelt werden wie eine Lösung von n einbasischen Säuren, jede von derselben molaren Konzentration wie die mehrbasische und einer entsprechenden Dissoziationskonstanten. Liegen die Dissoziationskonstanten genügend weit auseinander, so bildet jede Stufe für sich einen p_H-Sprung, so z. B. bei der Phosphorsäure. Für gewöhnlich weist aber die Titrationskurve nur einen einzigen auf. Der Abstand der Asymptote von der p-Achse ist in diesem Falle gleich der n-fachen molaren, d. h. gleich der normalen Konzentration der Säure.

Die Annahme, daß sich eine mehrbasische Säure durch eine entsprechende Zahl einbasischer ersetzen läßt, trifft nicht streng zu. Man kann aber zeigen, daß der Fehler, den man begeht, sehr klein ist und praktisch gar nicht in Frage kommt.

Wir benützen für die zweibasischen Säuren z. B. die Formel

$$b + h = s \cdot \left(\frac{k_1}{k_1 + h} + \frac{k_2}{k_2 + h} \right),$$

während der strenge Ausdruck lautet (siehe Koppel und Spiro):

$$b + h = S \cdot \frac{h k_1 + 2 k_1 k_2}{h (h + k_1) + k_1 k_2}.$$

Vergleicht man diese Ausdrücke, so findet man, daß man Zähler und Nenner des zweiten finden kann, wenn man von Zähler und Nenner des ersten die Größe hk subtrahiert. Nehmen wir an, daß der Nenner des Bruches n-mal größer sei als der Zähler z, so erhalten wir für den Fehler f den folgenden Ausdruck:

$$f = \frac{n-1}{n^2} \frac{h \cdot k_2}{z}.$$

Man kann nun leicht zeigen, daß für Werte von b, wie sie praktisch in Frage kommen, dieser Fehler klein bleibt gegen b.

Auf ähnliche Weise läßt sich der Fehler bei dreibasischen Säuren abschätzen.

Eine der häufigsten Aufgaben der Praxis besteht darin, aus der Azidität einer Lösung das Verhältnis der freien zu den gebundenen Säureäquivalenten zu berechnen. Wir beschränken uns erst auf zweibasische Säuren. Für die mehrbasische werden wir ein einfacheres Verfahren angeben.

Ist in einer Lösung h groß gegenüber der ersten Dissoziationskonstanten, so kann man die Säure in erster Annäherung als einbasische behandeln; man muß aber berücksichtigen, daß im Falle der zweibasischen Säuren der Abstand der Asymptote den Wert

$$d = 2 s - b$$

hat, wo s wieder die molare (nicht die normale) Konzentration der Säure bedeutet. Man findet also, wenn man dieselben Vereinfachungen zuläßt wie oben,

$$b = \frac{(d+b)\cdot k_1}{2(k_1+h)}$$

und daraus für das Verhältnis Q der freien zu den gebundenen Säureäquivalenten:

$$Q = \frac{2s-b}{b} = \frac{2h+k_1}{k_1}.$$

Ist die Gesamtkonzentration s z. B. durch chemische Analyse bekannt, so findet man für die Zahl der freien und der gebundenen Säureäquivalente die Werte:

$$2s - b = 2s \cdot \frac{Q}{Q+1},$$

$$b = 2s \cdot \frac{1}{Q+1}.$$

Man kann die Säure nicht mehr als einbasisch betrachten für Werte von h, welche in der Größenordnung ihrer ersten Dissoziationskonstanten liegen. In diesem Falle geht man von der Gleichung

$$b + h = \frac{(d+b)\cdot k_1}{2(h+k_1)} + \frac{(d+b)\,k_2}{2(h+k_2)}$$

aus. Daraus berechnet sich b zu

$$b = \frac{d\cdot k_1 (h+k_2) + d\cdot k_2 (h+k_1) - 2h(h+k_1)(h+k_2)}{2(h+k_1)(h+k_2) - k_1(h+k_2) - k_2(h+k_1)}.$$

Das letzte Glied im Zähler ist in bezug auf die kleinen Größen h, k und k von dritter Ordnung (sofern h nicht wesentlich größer ist als k_1), während die übrigen Glieder von zweiter Ordnung sind. Wir können es daher vernachlässigen. Man findet dann für Q den Wert

$$Q = \frac{2(h+k_1)(h+k_2) - k_1(h+k_2) - k_2(h+k_1)}{k_1(k_2+h) + k_2(k_1+h)}.$$

Das Verhältnis hängt also wie bekannt in erster Annäherung nur von der Wasserstoffionenkonzentration und den Dissoziationskonstanten ab.

Sind in der Lösung mehrere Säuren vorhanden, die chemisch nicht aufeinander einwirken, so kann man für jede einzelne den Quotienten Q berechnen. Kennt man ferner die Gesamtkonzentration s einer jeden, so kann man bestimmen, welchen Anteil die einzelne Säure an der Bindung der Kationen hat.

Für mehr als zweibasische Säuren kann man ähnliche Ausdrücke aufstellen. Sie sind aber für die praktische Ausrechnung wenig geeignet. Wir schlagen deshalb einen Weg ein, der zu übersichtlicheren Formeln führt.

Bekanntlich kann man bei einer mehrbasischen Säure jede Neutralisationsstufe als Salz der vorhergehenden auffassen. Bezeichnen wir mit a_1, a_2, a_3 . . . a_{n+1} die molare Konzentration der Säure in freier Form, in der ersten, zweiten . . . n-ten Neutralisationsstufe (freie Säure, primäres, sekundäres, tertiäres Salz usw.), so können wir nach der bekannten Hendersonschen Formel

$$h = k \cdot Q$$

die Verhältnisse $Q_1 = \frac{a_1}{a_2}$, $Q_2 = \frac{a_2}{a_3}$ . . . $Q_n = \frac{a_n}{a_{n+1}}$ berechnen. Ferner kennt man die molare Konzentration s der gesamten Säure und hat daher noch die Gleichung

$$a_1 + a_2 + \cdots a_{n+1} = s.$$

Aus den $n + 1$ Gleichungen kann man die $n + 1$ Unbekannten bestimmen und findet

$$a_1 = s \frac{Q_1 \cdot Q_2 \cdots Q_n}{1 + Q_n + Q_n Q_{n-1} + \cdots + Q_1 Q_2 \cdots Q_n},$$

$$a_2 = s \frac{Q_2 \cdots Q_n}{1 + Q_n + Q_n Q_{n-1} + \cdots + Q_1 Q_2 \cdots Q_n},$$

. . . . . .

$$a_{n+1} = s \frac{1}{1 + Q_n + Q_n Q_{n-1} + \cdots + Q_1 Q_2 \cdots Q_n}.$$

Das Verhältnis Q der freien zu den gebundenen Säureäquivalenten wird also

$$Q = \frac{n \cdot a_1 + (n-1)\, a_2 + \cdots a_n}{a_2 + 2a_3 + \cdots \; n a_{n+1}}.$$

Methodik.

Saftgewinnung. Die zu untersuchenden Früchte oder Blätter wurden etwas zerkleinert und in einer kleinen Handpresse ausgequetscht. Durch Abzentrifugieren wurden die im Saft suspendierten Verunreinigungen (Zellhäute usw.) entfernt.

Was wir untersuchen wollen, ist die Pufferung im Zellsaft. Es fragt sich also, ob der so gewonnene Preßsaft tatsächlich dem Zellsaft entspricht, oder ob er noch Bestandteile enthält, die dem Zellsaft ursprünglich fehlen, also Stoffe, welche aus dem zerquetschten Protoplasten oder den Chromatophoren stammen. Die Wahrscheinlichkeit, daß solche Stoffe beim Auspressen in solcher Menge in den Zellsaft gelangen, daß sie den Charakter seiner Pufferung wesentlich verändern, ist aber nicht sehr groß, denn das Auspressen ist eine verhältnißmäßig milde Behandlung. Es ist bekannt, daß es viel gröberer mechanischer Eingriffe bedarf, z. B. des Zerreibens mit Quarzsand, um die Zellen soweit zu zerstören, daß die in ihnen enthaltenen Stoffe quantitativ herausgelöst werden können. Mit der Möglichkeit schwacher Verunreinigungen ist aber immer zu rechnen.

Messung: Die Messungen wurden alle elektrometrisch ausgeführt mit derselben Apparatur, wie sie Michaelis in seinem Praktikum der physikalischen Chemie (1926) angibt. Als Bezugselektrode diente die gesättigte Kalomelelektrode.

Die Elektrode zur Aufnahme der zu messenden Flüssigkeit war folgendermaßen gebaut:

Als Gefäß diente ein Wägegläschen von etwa 30 ccm Inhalt. Es wird durch einen Kautschukstopfen mit fünf Bohrungen verschlossen. Die Bohrungen enthalten:

1. Die Platinelektrode. Ein kurzer Platindraht in ein Glasrohr eingeschlossen, Quecksilberkontakt.

2. Ein kurzes Glasrohr mit einem Stück Gummischlauch, das durch einen Quetschhahn verschlossen werden kann, dient zum Entweichen des Wasserstoffs.

3. Das Zuführungsrohr für den Wasserstoff. Dieses reicht bis auf den Boden uud ist in eine Kapillare ausgezogen.

4. Ein Glasrohr, weit genug zum Einführen des Auslaufrohrs einer Bürette und des Thermometers.

5. Den Agarheber.

Die Elektrode hat sich bei den Serienbestimmungen sehr gut bewährt. Ich habe immer zwei zugleich verwendet, um die Titrationen mit Säure und Lauge gleichzeitig ausführen zu können. Die Messung geschah folgendermaßen:

Durch Bohrung 4 läßt man die Säure oder Lauge einfließen und verschließt alsdann die Öffnung durch das Thermometer. Sodann läßt man drei Minuten den Wasserstoff (der nacheinander durch gesättigte Sublimatlösung, Kaliumpermanganat, Pyrogallol und destilliertes Wasser durchgeschickt wird) durch die Lösung perlen, verschließt Öffnung 2 durch den Quetschhahn und mißt. (Bei stark schäumenden Flüssigkeiten werden einige Tropfen Amylalkohol zugesetzt.) Dasselbe wird noch einmal, eventuell zweimal wiederholt und zum Schluß die Elektrode bis zur letzten Kontrolle des Potentials noch etwa drei Minuten stehen gelassen. Gewöhnlich erweist sich das Potential schon bei der zweiten Ablesung als konstant. Eine Messung dauert 10 bis 12 Minuten.

Die Zeit, welche zur konstanten Einstellung des Potentials nötig ist, hängt nicht nur von der Güte der Platinierung der Elektrode, sondern auch von der Art der zu messenden Flüssigkeit ab. Die Einstellung erfolgt meist rasch am Anfang der Titration. Nachdem aber die Elektrode eine Zeitlang in der Flüssigkeit gestanden hat, zeigen sich oft Unregelmäßigkeiten. Es kommt bei der zweiten Messung oft vor, daß das Potential unmittelbar nach der Unterbrechung des Wasserstoffstromes viel niederer ist als bei der ersten Messung. Allmählich steigt es wieder auf den ersten Wert an, oft noch höher. Meist ist es nicht leicht, die Fehlerquelle festzustellen. Es ist möglich, daß mit der Zeit die Elektrode durch Bildung von Niederschlägen auf ihrer Oberfläche verdirbt, oder es kann sich auch während der Messung das p_H tatsächlich ändern.

Wir haben im allgemeinen Teil darauf hingewiesen, daß bei der Titration die Konzentration des Puffers konstant bleiben muß. Man kann das praktisch auf zwei Arten erreichen:

1. Steht eine genügende Menge Flüssigkeit zur Verfügung, so verwendet man zur Titration möglichst viel Flüssigkeit und möglichst konzentrierte Säure oder Lauge, damit die Änderung des Volumens nur klein bleibt und vernachlässigt werden kann.

2. Steht hingegen nur wenig Flüssigkeit zur Verfügung, so ist es durch folgenden Kunstgriff möglich, die Konzentration des Puffers konstant zu halten (Ich verdanke denselben der Freundlichkeit des Herrn Dr. H. Moser.) Er besteht darin, daß man die Versuchslösung auf die Hälfte verdünnt und bei

Titration mit der Säure oder Lauge dasselbe Volumen der unverdünnten Versuchslösung zufügt. In der ursprünglichen Lösung, deren Volumen v_0 beträgt, sei die Konzentration des Puffers c. Nach der Verdünnung beträgt sie daher $\frac{c}{2}$ und das Volumen $2v_0$. Setzt man nun nach Vorschrift mit v ccm Säure v ccm der unverdünnten Lösung zu, so wird die Konzentration des Puffers

$$\frac{v_0 c + vc}{sv_0 + 2v} = \frac{c}{2}$$

Sie verändert sich also nicht. Man sieht leicht, daß man anfänglich die Lösung beliebig verdünnen kann, nur muß dann die während der Titration zugesetzte Lösung zur Säure im selben Verhältnis stehen, wie das Volumen der unverdünnten Lösung zum Wasserzusatz.

Bei dieser Art der Titration erhält man nicht die Titrationskurve der natürlichen, sondern der verdünnten Lösung. Nun ist aber das p_H einer Pufferlösung in erster Annäherung nur abhängig vom Verhältnis von Säure zu Salz. Wir können also annehmen, daß wir bei der unverdünnten Lösung zur Erreichung desselben p_H genau die doppelte Säure oder Lauge verbraucht hätten. Streng genommen, verändert eine jede Pufferlösung ihre Azidität beim Verdünnen, was schon theoretisch aus der exakteren Formel

$$b + h = s \cdot \frac{k}{k+h} \left(\text{statt } b = s \cdot \frac{k}{k+h} \right)$$

folgt. Die Veränderungen sind aber so klein, daß sie für unsere Versuche nicht in Betracht kommen. Die Fehler in den Ordinaten sind prozentual am größten in der Nähe des Schnittpunktes der Kurve mit der p-Achse, denn hier fällt bei den stark sauren Gemischen, wie ich sie untersuchte, die Vernachlässigung des h als Summand in der obigen Formel ins Gewicht. Bei so komplizierten Gemischen wie die Pflanzensäfte können beim Verdünnen noch alle möglichen chemischen oder physikalischen Veränderungen eintreten, welche rechnerisch nicht zu fassen sind.

Um ein Bild zu geben von der Größe der Verschiebungen, sind in der folgenden Tabelle die Wasserstoffexponenten einiger verdünnter und unverdünnter Säfte einander gegenübergestellt

	p_H	
	verdünnt	unverdünnt
Saft saurer Äpfel	2,83	2,80
Saft süßer Äpfel	4,49	4,39
Preßsaft aus den Blättern von Aspidistra .	6,00	5,93
Preßsaft aus dem Stengel von Opuntia .	4,98	4,89
Saft reifer Weintrauben	3,02	2,97

Zur Berechnung des Verhältnisses der freien und gebundenen Säure wurde immer der Wert des unverdünnten Saftes verwendet.

Bei verschiedenen Pflanzensäften bilden sich bei Laugenzusatz Niederschläge. Es fragt sich nun, inwieweit dadurch Fehler entstehen können. Diese Niederschläge können auf zweierlei Art zustande kommen. Erstens kann es sich um die Bildung unlöslicher Salze handeln, wie z. B. bei der Titration von Wein-

säure mit Kalilauge, in diesem Falle ist das Kation der Lauge verantwortlich zu machen. Zweitens kann eine Ausflockung im Sinne der Kolloidchemie eintreten. Hier zeigt sich meistens, daß die Vermehrung der Hydroxylionen Ursache der Fällung ist. Im ersten Falle kann der Verlauf der Titrationskurve durch die Fällung stark verändert werden; es sind sogar Fälle denkbar, in denen das Vorzeichen der Pufferung umgekehrt wird. So wird bei Titration einer Lösung von Kaliumchlorid mit Weinsäure durch das Freiwerden von Salzsäure das p_H der Lösung viel stärker verändert als p_H des Wassers, d. h. es tritt der Fall „negativer Pufferung" ein. Im zweiten Fall, bei einfacher Flockung, tritt keine wesentliche Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration ein, denn der Vorgang beruht auf einer elektrischen Entladung und verbraucht als solcher keine meßbaren Mengen von Wasserstoff- oder Hydroxylionen. (Siehe bei Michaelis, The effects of ions in colloidal systems. Baltimore 1925, S. 67.) Eine solche Flockung kann auf den Verlauf der Titrationskurve einen Einfluß haben, wenn der ausfallende Körper selbst ein Puffer ist; denn in diesem Falle wird die Pufferkapazität des Systems verkleinert.

Ich habe bei den Pflanzensäften nie feststellen können, daß die Fällung einen merklichen Einfluß auf den Verlauf der Titrationskurve hatte, obschon sie stets ziemlich scharf bei einem bestimmten p_H einsetzte. Man kann daher annehmen, daß den ausfallenden Verbindungen keine Bedeutung für die Pufferung zukommt, daß man also auf das System die gewöhnlichen Gleichungen anwenden kann, die zur Voraussetzung haben, daß alle Körper, die bei der Pufferung reagieren, in Lösung bleiben.

Wesentliche Fehler können entstehen, wenn die Säfte größere Mengen von Karbonaten enthalten. Durch Säurezusatz wird Kohlensäure frei, welche teils als Gas entweicht, teils sich im Wasser löst und mit den vorhandenen Karbonaten ein Puffersystem bildet. Der durchströmende Wasserstoff wäscht sie aus und verändert somit die Pufferkapazität der Lösung und, wenn die Karbonate wesentlichen Anteil an der Pufferung haben, auch das p_H. Das ist der Grund, warum man das Blut nicht im strömenden Wasserstoff messen kann.

Es ist nun sehr wenig wahrscheinlich, daß die Pflanzensäfte gelöste Karbonate in größerer Menge enthalten. Ihr p_H liegt mit wenigen Ausnahmen unter 5; bei dieser hohen Azidität kann aber Bikarbonat nur in Spuren vorhanden sein. Zudem verlaufen die Kurven gerade in demjenigen p_H-Bereich, in welchem Kohlensäurefehler entstehen könnten, sehr flach. Ein fehlerhafter Wert von p, d. h. die Verschiebung eines Punktes in Richtung der p-Achse, würde also an ihrem Verlauf nur sehr wenig ändern.

Bestimmung des Zahlenwertes von Pufferung und Pufferkapazität. Man bestimmt sie am besten rein graphisch, indem man die Titrationskurven der Lösung und des Wassers in dasselbe Koordinatensystem einträgt, die Differenz der Ordinaten nimmt und an die so entstehende Kurve die Tangente legt. Zwischen p_H 3 und p_H 11 kann man ohne weiteres die Tangente an die Titrationskurve selbst legen, weil die Titrationskurve des Wassers hier praktisch mit der Abszissenachse zusammenfällt.

Für Werte von p, welche kleiner als 3 und größer als 11 sind, ist die Bestimmung der Differenz $S - S_0$ meist recht schwierig, da hier die Kurven sehr steil verlaufen. Der Grenzwert von $S - S_0$ ist deshalb gewöhnlich nicht sicher anzugeben. Ein geringer Fehler in der Bestimmung des p_H bewirkt einen großen Unterschied in den Ordinaten.

Beispiel: (Bedeutung von S und S_0 siehe oben, S. 3.)

Preßsaft von Weintrauben

p_H	S	S_0	$S - S_0$
2,86	0,006	0,001	0,005
2,69	0,010	0,002	0,008
2,35	0,020	0,004	0,016
2,07	0,029	0,008	0,021
1,85	0,038	0,014	0,024
1,59	0,055	0,026	**0,029**
1,42	0,071	0,038	**0,033**
1,23	0,078	0,059	**0,019**
1,08	0,112	0,083	**0,029**
0,90	0,146	0,126	**0,020**

Wie man sieht, schwanken die in der Tabelle fettgedruckten Werte von $S - S_0$ beträchtlich und konvergieren nicht gegen einen konstanten Wert, die Kationenkonzentration der Lösung. Aus der Azidität des Saftes berechnet sich diese zu 0,034.

Allgemeines über die Pufferung bei den Pflanzen.

Pufferung einer biologischen Flüssigkeit bedeutet immer deren Fähigkeit, der Verschiebung ihrer Wasserstoffionenkonzentration einen gewissen Widerstand entgegenzusetzen. Die Frage nach der Bedeutung der Pufferung wird daher immer zurückgehen müssen auf die Frage, welche Bedeutung die Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration für den Organismus in irgendeinem seiner Organe hat.

Die Wichtigkeit der Wasserstoffionen für den Organismus und damit die Wichtigkeit einer Regulation ihrer Konzentration läßt sich auch vom rein physikalisch-chemischen Standpunkt aus ohne weiteres ermessen.

Es ist bekannt, von welch großer Bedeutung die Wasserstoffionenkonzentration in kolloiden Systemen ist. Die Stabilität der Kolloide, die biologisch wichtigen Vorgänge der Quellung und Entquellung hängen weitgehend von ihr ab, wenn auch nicht immer in erster Linie und in einfacher Weise. Sie hat ferner großen Einfluß auf die Löslichkeit wichtiger anorganischer und organischer Salze, wie der Phosphate und Urate, um einige wenige einfache Beispiele zu nennen. Neben diesen physikalisch übersehbaren Wirkungen ist natürlich nicht zu vergessen die unübersehbare Menge komplizierter biologischer Vorgänge, die von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig ist. Wir erinnern nur an die fermentativen Erscheinungen, deren Studium ja eigentlich den Anstoß zu allen folgenden Untersuchungen über die Wasserstoffionenkonzentration gegeben hat (Sörensen).

Bekanntlich ist die Wasserstoffionenkonzentration einer der bestimmtesten Faktoren für das Optimum der Fermentwirkung. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß dieses Optimum keine für das einzelne Ferment bestimmte Größe zu sein braucht, sondern je nach dem Substrat variiert. (Ucko und Bansi 1927.) Diese Feststellung zeigt eine Möglichkeit, wie der Organismus durch Veränderung des p_H regulatorisch auf die Tätigkeit seiner Fermente einwirken kann, beweist also aufs neue die Wichtigkeit einer Regulation der Wasserstoffionenkonzentration.

Es wird also eine Änderung des p_H stets eine Änderung im chemischen Gleichgewicht des Organismus zur Folge haben. Wesentlich für ihn ist nur, die Schwankungen innerhalb gewisser Grenzen zu halten, so daß das Gleichgewicht nicht zerstört wird.

Wir haben im allgemeinen Teil schon darauf hingewiesen, daß die Pflanze vor allem eines Schutzes gegen die Ansäuerung durch organische Säuren bedarf. Die Säuren spielen eine ungemein wichtige Rolle im Stoffwechsel der Pflanze.

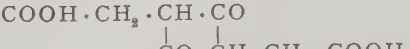
Der Abbau der hochmolekularen organischen Verbindungen, sowohl der Kohlehydrate als auch der Fette und auch der Proteine führt in erster Linie zu Verbindungen mit Säurecharakter, Oxysäuren, Ketosäuren, Aminosäuren. Dieselben Säuren sind auch wieder die Bausteine bei der Synthese der genannten Stoffe (wir werden darauf noch eingehend zu sprechen kommen). Sie werden vielerorts in großer Menge angehäuft, z. B. in den Blättern der sukkulenten Pflanzen oder im Fruchtfleisch verschiedener Früchte. Trotzdem beobachten wir nirgends die saure Reaktion, wie sie dem Säuregehalt der Organe entspricht. Folgende Zahlen, die sich auf den Preßsaft unreifer Äpfel beziehen, zeigen dies deutlich:

Konzentration der freien Säure	p_H beobachtet	p_H der freien Säure entsprechend
0,24	2,80	2,0
0,14	2,98	2,17

Die Fähigkeit der Pflanze, sich gegen starke Ansäuerung zu schützen, beruht vor allem darauf, daß sie einen Überschuß der Kationen über die anorganischen Anionen besitzt. Die Aschenanalysen der meisten Pflanzen und Pflanzenorgane zeigen dies aufs deutlichste. Diese Tatsache stimmt aufs beste überein mit dem Ergebnis der Theorie, daß die Pufferung bei gegebener Puffersäure wesentlich vom Alkaligehalt des Systems abhängt. Als Puffer wirkt in diesem Falle einfach das Salz der betreffenden Säure.

Wir führen hier noch eine Art des Säureschutzes an, die von der eben genannten prinzipiell verschieden ist. Wenn auch noch nicht erwiesen ist, daß sie in der Natur eine Rolle spielt, so ist sie immerhin interessant.

Es handelt sich um die Entsäuerung durch Anhydridbildung. Franzen und Ostertag (1922) fanden in Echeveria secunda glauca das Malylapfelsäuredianhydrid:



das sich durch Zusammentreten zweier Moleküle Apfelsäure unter Wasseraustritt bildet. Die Autoren bemerken hierzu:

„Eine Apfelsäurelösung wird also bei der Bildung von Malylapfelsäure um die Hälfte weniger sauer, vorausgesetzt, daß die Dissoziationskonstanten der beiden Säuren gleich groß sind; und damit ist der Pflanze ein Mittel an die Hand gegeben, um sich zu entsäuern falls die Azidität zu groß wird, ohne dazu Basen notwendig zu haben. Soll die Apfelsäure dann wieder, vielleicht zu Atmungszwecken mobilisiert werden, so ist hierzu lediglich eine fermentative Aufspaltung notwendig."

Wenn nun auch eine solche Anhydridbildung im Reagenzglas bei Apfel- oder Weinsäure nicht beobachtet werden kann, so schließt das nicht aus, daß sie in der Natur unter dem Einfluß bestimmter Fermente dennoch stattfindet.

Man kann sich vorstellen, daß bei Vermehrung der Wasserstoffionenkonzentration durch irgendeine Regulation in der Zelle Bedingungen geschaffen werden, welche die Entstehung des Anhydrids ermöglichen, dadurch z. B., daß ein Enzym gebildet wird. Daß der Organismus die enzymatischen Vorgänge weitgehend regulieren kann, ist bekannt. Man kennt aus der Tier- und Pflanzenphysiologie zahlreiche Beispiele, welche zeigen, daß er Enzyme nach Bedarf bildet oder aktiviert (Zuckerspaltung im Blut bei parenteraler Zuführung; Anpassung der Pilzfermente an das Substrat, Kylin 1914), oder daß er durch einfache chemische Regulation erst im Augenblicke des Bedarfs die optimalen Bedingungen für ihre Wirkung schafft. So bilden z. B. bei der Fettverdauung im Darm die ersten Spuren der abgespaltenen Fettsäuren Seifen, welche die Aktivität der Lipase sehr stark erhöhen. (Siehe Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Memmen 1923.) Auch bei der Mobilisierung der Fette im Rizinussamen scheinen regulatorische Vorgänge eine Rolle zu spielen. (Willstätter und Waldschmidt-Leitz 1924.) Es ist daher sehr wohl möglich, daß auch die Anhydridbildung, wenn eine solche überhaupt stattfindet, auf ähnliche Art geregelt werden kann. Man kann dann die Pufferung als eine Frage des Gleichgewichtes zwischen Säure und Anhydrid betrachten, etwa nach folgendem Schema:

$$2\ \text{Säure} \rightleftarrows 1\ \text{Anhydrid} + \text{Wasser}.$$

Da man die Konzentration des Wassers als konstant ansehen darf, folgt als Gleichgewichtsbedingung:

$$\frac{(\text{Säure})^2}{\text{Anhydrid}} = \text{konst.}$$

Fügt man zu einem solchen System neue Säure hinzu, so muß ein Teil derselben in das Anhydrid übergehen, damit das Gleichgewicht bestehen bleibt, d. h. (immer unter der Voraussetzung, daß die Dissoziationskonstante der Säure im Anhydrid nicht wesentlich größer ist als die der freien Säure) die Zahl der freien Karboxylgruppen wird vermindert, die Azidität also geringer, mit anderen Worten, es tritt Pufferwirkung ein. Freilich ist dabei zu berücksichtigen, daß die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Säure und Anhydrid beträchtliche Zeit erfordern kann. Eder und Kutter (1926) fanden für Milchsäure 60 bis

100 Tage. Es ist aber sehr wohl möglich, daß bei der Apfelsäure diese Zeit eine viel kürzere ist.

Wir lassen es dahingestellt, ob diese Art der Pufferung in der Natur tatsächlich eine Rolle spielt. Sie ist aber trotzdem von Interesse, weil sie die Möglichkeit eines Puffersystems erweist, das zu seiner Wirkung nicht irgendeines säurebindenden Körpers bedarf, sondern einfach dadurch wirkt, daß es die Säure in einen weniger wirksamen Zustand überführt, vielleicht mit Hilfe irgendeines Fermentes.

Es ist klar, daß die Titrationskurve eines Säure-Salzgemisches anders verlaufen muß, wenn ein Teil der Säure als Anhydrid vorhanden ist, als wenn sie nur in freier Form existiert. Ich habe eine derartige Abweichung bei den Pflanzensäften, die ich untersuchte, aber nie feststellen können. Die Pufferung durch Anhydridbildung kann also in diesen Fällen nur eine ganz untergeordnete Rolle spielen.

Der Umstand, daß die Säuren im pflanzlichen Organismus so verbreitet sind und daß sie immer, wenn auch nur zu einem geringen Teile, in Form ihrer Alkalisalze zugegen sind, bewirkt, daß alle Pflanzensäfte größere oder geringere Pufferwirkung zeigen. Wir sind aber weit davon entfernt zu wissen, welche biologische Bedeutung die Pufferung im einzelnen hat. Dazu kennen wir die chemischen und physikalischen Vorgänge in den Zellen viel zu wenig. Wir wissen einzig, daß extrem saure Reaktion und extrem alkalische Reaktion dem Organismus schaden und daß aus diesem Grunde eine gewisse Pufferung der Säfte und Gewebe offenbar notwendig ist.

Was wir beim Auspressen der Pflanzenteile gewinnen, ist im wesentlichen der Zellsaft. Nun wissen wir aber keineswegs, ob seine Zusammensetzung in allen Teilen des ausgepreßten Gewebes dieselbe ist. Wir dürfen es mit einiger Sicherheit annehmen, wenn alle Zellen physiologisch gleichwertig sind, d. h. wenn sich in ihnen dieselben biochemischen Vorgänge abspielen. Aber auch dies läßt sich in den wenigsten Fällen mit einiger Sicherheit feststellen. Wir müssen meist von morphologischen Kennzeichen auf die Funktion schließen. (Vorhandensein gewisser leicht erkennbarer Stoffe wie Chlorophyll, Stärke, Kalziumoxalat usw.) Aber hier ist große Vorsicht geboten. Wir wissen z. B., daß bei den verdauenden Vakuolen der Infusorien die Reaktion in den einzelnen Vakuolen desselben Infusors eine ganz verschiedene sein kann. Auf alle Fälle gibt der ausgepreßte Zellsaft, wie wir ihn bei unseren Versuchen verwendet haben, immer nur einen durchschnittlichen Wert für die Verteilung der Säuren und Basen und der damit zusammenhängenden Erscheinungen. Wie die Verhältnisse in den einzelnen Zellen liegen, können wir aus seiner Analyse gar nicht feststellen. Daß in den verschiedenen Zellen eines gleichartigen Gewebes ganz verschiedene Konzentrationen der Stoffe herrschen können, zeigen vor

allem auch die osmotischen Untersuchungen. Da nun gerade die Pflanzensäuren zu den osmotisch wirksamen Stoffen gehören, kann man wohl annehmen, daß ihre Konzentration in den verschiedenen Zellen eines Gewebes verschieden sein kann. Ursprung und Blum (1921) sehen sich durch ihre Untersuchungen sogar genötigt, innerhalb ein und derselben Zelle verschiedene Konzentrationen der osmotisch wirksamen Stoffe anzunehmen.

Nun stellt aber die Vakuole mit ihrem Inhalt, dem Zellsaft, nur einen Teil der Zelle dar; vom biochemischen Standpunkt aus betrachtet, ist er wahrscheinlich der viel einfachere als der Protoplast. Die subtilsten und am feinsten regulierten Vorgänge spielen sich offenbar im letzteren ab.

Der Zellsaft scheint gegen Gleichgewichtsstörungen viel weniger empfindlich zu sein als das Protoplasma. Wir wissen aber nicht, welche Vorgänge sich im ersteren und welche sich im letzteren abspielen. Den jungen Zellen meristematischer Gewebe fehlt die Vakuole, obwohl sie sich in lebhaftester Tätigkeit befinden. Man kann annehmen, daß im Zellsaft Stoffe deponiert werden, die der Protoplast braucht oder hervorbringt, die aber infolge bestimmter Eigenschaften seine feinen chemischen Mechanismen stören würden. Solche Stoffe sind offenbar gerade die Säuren. Der Protoplast besitzt offenbar zur Regulation der Wasserstoffionenkonzentration seine eigenen Einrichtungen, die von denen des Zellsaftes weitgehend unabhängig sind. Wir erfassen mit der Untersuchung des letzteren immer nur einen Teil der Puffersysteme der Pflanze.

Den Vorstellungen gemäß, die wir uns von physikalisch-chemischen Organisationen des Protoplasmas machen, müssen wir überhaupt annehmen, daß in den verschiedenen Teilen der Zelle eine verschiedene Konzentration der Wasserstoffionen herrscht, da wir es mit heterogenen Gleichgewichten zu tun haben. Wir müssen annehmen, daß in der Zelle, gleichzeitig, aber räumlich getrennt, die verschiedenartigsten Reaktionen stattfinden. (Siehe Hofmeister 1901, Spiro 1922.) In diesem Zusammenhang erhält auch die oben erwähnte Verschiedenartigkeit der Optima der Fermentwirkung für verschiedene Substrate eine gewisse biologische Bedeutung.

Die Annahme, daß zwischen den einzelnen Teilen der Zelle Unterschiede der Azidität bestehen müssen, wird zwingend notwendig für die Zellen, welche Chlorophyll enthalten. Dieses ist ungemein säureempfindlich und kann bei der Azidität, wie sie im Zellsaft herrscht, unmöglich bestehen.

Willstätter und Stoll (1918) haben gezeigt, daß es in kolloider wässeriger Lösung schon durch die Kohlensäure der Luft in Phaeophytin und Magnesiumbikarbonat zerlegt wird; bei höherer Wasserstoffionenkonzentration geht der Zerfall augenblicklich vor sich. In den Blättern der meisten Pflanzen liegt das p_H zwischen 4 und 6. Es muß also unbedingt im Chromatophoren die Reaktion alkalischer sein als im Zellsaft.

Merkwürdig ist nun, daß bei der Kohlensäureassimilation das Chlorophyll scheinbar gerade mit einem ausgesprochen sauren Körper in Beziehung tritt ohne zerstört zu werden. Die Tatsache erklärt sich daraus, daß offenbar die Kohlensäure gar nicht als solche an das Chlorophyll herankommt, sondern daß sie erst in eine Form übergeführt wird, in welcher sie nicht mehr als Säure wirken kann. Es muß also im Blatt ein Puffersystem existieren, das speziell die Kohlensäure bindet und unwirksam macht. Es ist erwiesen, daß eine solche Bindung der Kohlensäure unabhängig von der Assimilation erfolgt. Willstätter und Stoll (loc. cit.) diskutieren eingehend, welche Stoffe hierfür in Betracht kommen könnten. Es sind zahlreiche Verbindungen bekannt, welche Kohlensäure direkt zu addieren vermögen. Siegfried (1905, 1908, 1909) fand diese Eigenschaft bei zahlreichen Aminosäuren, Amiden, Peptiden, ferner bei Körpern mit Hydroxylgruppen, wie Alkoholen, Zuckern und Oxysäuren. Das sind alles Verbindungen, die in der Pflanze häufig vorkommen. An welche bestimmten Stoffe die Kohlensäure gebunden wird und welcher Art die Bindung ist, wissen wir aber nicht. Siegfried nimmt im Falle der Aminosäuren die Bildung von Karbominaten an, Loeffler und Spiro (1919) denken an die Bildung lockerer Komplexe im Sinne der Wernerschen Valenzlehre. Erst eine genaue Kenntnis des Assimilationsvorganges kann uns die Kenntnis dieses interressanten Puffersystems vermitteln.

Spezieller Teil.

I. Früchte.

Ich habe die Preßsäfte des Fruchtfleisches der folgenden Früchte untersucht: Äpfel, Weintrauben, Zitronen, Tomaten.

Der Saft wurde durch einfaches Auspressen der Früchte gewonnen und stets frisch untersucht.

Die meisten Säfte enthalten einen Farbstoff, der bei saurer Reaktion einen anderen Farbton zeigt als bei alkalischer, also einen Indikator. So schlägt z. B. beim Apfelsaft die gelbe Farbe der nativen Flüssigkeit in ein schönes Rotbraun um. (Bei p_H 7.)

Die Früchte sind im allgemeinen die säurereichsten Organe der Pflanze. Es gibt nur wenige Spezies, bei denen auch Stengel und Blätter einen ähnlichen Säuregehalt aufweisen, wie etwa Oxalis oder Rheum. Aber auch die verschiedenen Früchte unter sich zeigen große Unterschiede im Gehalt an freier Säure. Sehr wenig Säure z. B. besitzen die süßen Äpfel, ganz beträchtliche Mengen hingegen die Zitronen oder die unreifen Weintrauben. Einige Beispiele:

Süße Äpfel (unreif)	0,01—0,02 freie Säureäquivalente
Saure Äpfel (unreif)	0,16
Weintrauben (reif)	0,14
Weintrauben (unreif)	0,4
Zitrone	1,37

Zum Vergleich

Blätter von Sedum (morgens)	0,08
Stengel von Rheum	0,16

Die Titrationskurven zeigen alle den Verlauf, der für das Gemisch einer schwachen Säure mit ihrem Salz charakteristisch ist. Wenn ein solches Puffergemisch mehr als eine Säure enthält, so ist es im allgemeinen nicht möglich, die Art der Säuren aus der Titrationskurve zu bestimmen. Die chemische Analyse muß die Titration ergänzen. Über die Säure der Früchte, die ich untersucht habe, existieren in der Literatur zahlreiche Angaben. Es enthalten:

Äpfel: Apfelsäure,
Weintrauben: Apfelsäure und Weinsäure,
Zitronen: Zitronensäure,
Tomaten: Apfelsäure und Zitronensäure.

Wie schon im methodischen Teil erwähnt wurde, ist wegen der Steilheit der Titrationskurven die direkte Bestimmung des Verhältnisses der freien und gebundenen Säureäquivalente nicht möglich. Dieses Verhältnis muß immer aus dem p_H des Saftes errechnet werden.

Äpfel.

Es wurden zwei Sorten Äpfel, eine saure und eine süße, untersucht. Zu einem Versuch wurden stets mehrere Früchte desselben Baumes verwendet. Die Untersuchung verschiedener Reifestadien bestätigte die alte Erfahrung, daß mit der Reife der Gehalt an Säure abnimmt und zwar der Gesamtgehalt. Es wird also nicht einfach die freie Säure neutralisiert durch Zufuhr von Mineralstoffen, sondern der Gehalt an Kat-

ionen bleibt annähernd derselbe und die Säure verschwindet aus der Frucht.

Saure Äpfel.

Die Äpfel enthalten hauptsächlich die Apfelsäure. Die beiden Dissoziationskonstanten der Apfelsäure liegen so nahe beieinander, daß der mittlere Ast der Titrationskurve durchaus gradlinig verläuft und eine Säure mit nur einer Dissoziationsstufe vortäuscht. Man erkennt aber sofort, daß es sich nicht um eine einbasische Säure handeln kann, wenn man die Steilheit der Kurve im Wendepunkt mißt. Sie ist viel zu groß.

Aus praktischen Gründen sind alle Kurven so aufgetragen, daß auf der Abszissenachse der Zentimeter die Einheit ist, während auf der Ordinatenachse 5 cm der Konzentration 0,1 entsprechen. Stellt man in bezug auf dieses Koordinatensystem die Steilheit der empirischen Kurven und der theoretischen einander gegenüber (unter Annahme einer einbasischen Säure), so findet man

beobachtet	berechnet
1,6	2,9
2,5	4,3
1,5	2,8

Zum Vergleich gebe ich die Zahlen einer reinen Lösung von Apfelsäure:

1,3	2,3

Es ist bei jeder Titration eines Systems, dessen Komponenten man nicht kennt, durchaus nötig, die Steilheit zu messen, denn auf diese Weise erkennt man sofort, ob eine ein- oder mehrbasische Säure, bzw. mehrere einbasische vorliegen.

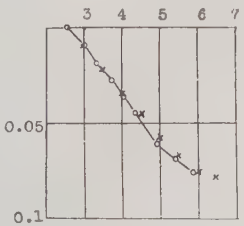


Fig. 1.
Apfelsäure.

Es liegt also in unserem Falle sicher keine einbasische Säure vor. Um entscheiden zu können, ob die Abweichungen der empirischen von den theoretischen Kurven innerhalb der Fehlergrenzen der Methode und der Genauigkeit der Formeln liegen oder ob sie darauf zurückzuführen sind, daß der Saft außer der Säure noch andere Puffersubstanzen enthält, titrierte ich eine reine Apfelsäurelösung. Die folgende Tabelle (ebenso Fig. 1) zeigt die Übereinstimmung von Versuch und Rechnung:

Apfelsäure, titriert mit n-NaOH.

p_H	L Konzentration der Lauge gefunden	L Konzentration der Lauge berechnet
3,0	0,010	0,011
3,5	0,022	0,022
4,0	0,035	0,035
4,5	0,049	0,046
5,0	0,062	0,058
5,5	0,070	0,067
6,0	(0,077)	0,074
6,5	(0,080)	0,079

Die eingeklammerten Werte sind einer anderen Titration entnommen. Die theoretischen Werte sind graphisch bestimmt. Es wurden eine Anzahl Punkte der Kurve berechnet, die Kurve aufgezeichnet und die Werte daraus entnommen. Dasselbe gilt für alle folgenden Tabellen.

Um zu zeigen, wie gut bei sehr exakten Titrationen Versuch und Rechnung übereinstimmen können, stellen wir die Werte, die Hastings und van Slyke (1922) bei der Titration von Zitronensäure gefunden haben, den berechneten gegenüber.

Titration von 0,1 mol. Zitronensäure nach van Slyke.

L	p_H gefunden	p_H berechnet
0,0395	2,88	2,80
0,0592	3,14	3,17
0,0790	3,42	3,54
0,0987	3,67	3,75
0,1183	3,98	3,98
0,1381	4,20	4,20
0,1578	4,46	4,43
0,1775	4,69	4,69
0,1973	4,94	4,92
0,2170	5,18	5,18
0,2368	5,42	5,41
0,2564	5,70	5,72
0,2762	6,06	6,03

Man sieht aus diesen beiden Tabellen, daß oben abgeleitete Formeln die Titrationskurven recht gut wiedergeben und daß die Abweichungen innerhalb der Fehlergrenze der Methode fallen (Ungenauigkeiten im

Ablesen der Büretten, Schwankungen der Temperatur während der Messung usw.). Fig. 1 gibt denselben Versuch wie die erste Tabelle wieder.

Die folgenden Tabellen sowie Fig. 2 zeigen das Ergebnis einiger Titrationen bei verschiedenen Reifungsstadien. (Bezeichnungen siehe erster Teil.)

Saure Äpfel, unreif (gepflückt am 23. Juli)

p_H des frischen Saftes	2,80
Freie Säureäquivalente	0,24
Gebundene Säureäquivalente	0,052
	Q = 4,6
Molare Konz. der ges. Säure	0,146

L	p_H gefunden	p_H berechnet
0,010	3,01	3,12
0,019	3,18	3,38
0,028	3,39	3,60
0,037	3,59	3,74
0,045	3,79	4,00
0,053	3,98	4,23
0,068	4,32	4,60
0,083	4,64	5,00
0,096	4,96	5,31
0,109	5,45	5,78

Saure Äpfel, unreif (gepflückt am 16. August)

p_H des frischen Saftes	2,98
Freie Säureäquivalente	0,140
Gebundene Säureäquivalente	0,047
	Q = 3,0
Molare Konz. der ges. Säure	0,098

L	p_H gefunden	p_H berechnet
0,010	3,37	3,37
0,019	3,65	3,78
0,028	3,98	4,20
0,037	4,29	4,64
0,045	4,58	4,95
0,059	5,16	5,50

Saure Äpfel, unreif (gepflückt am 24. August)

p_H des frischen Saftes	2,95
Freie Säureäquivalente	0,16
Gebundene Säureäquivalente	0,053
	Q = 3,0
Molare Konz. der ges. Säure	0,106

L	p_H gefunden	p_H berechnet
0,005	3,13	3,17
0,010	3,32	3,35
0,019	3,58	3,72
0,028	3,88	4,04
0,037	4,14	4,34
0,053	4,65	4,92
0,061	4,93	5,20
0,070	5,26	5,50

Die Tabellen zeigen, daß die empirischen Kurven systematisch von den berechneten abweichen, und zwar so, daß die tatsächlich beobachteten Werte der Wasserstoffionenkonzentration immer höher sind als die berechneten. Es zeigte sich nun, daß sehr wahrscheinlich der Zuckergehalt der Früchte für diese Abweichung verantwortlich zu machen ist. Die folgenden Versuche geben darüber Aufschluß.

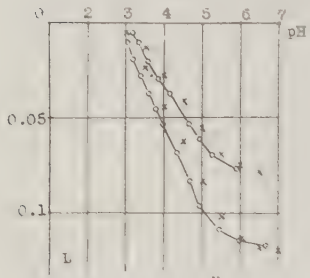


Fig. 2. Saure Äpfel.
○ gefundene Werte.
× berechnete Werte.

Eine Lösung von Apfelsäure wurde mit Glukose versetzt und mit der Titrationskurve einer Lösung ohne Glukose verglichen. Die folgende Tabelle gibt Aufschluß über das Ergebnis des Versuchs, ebenso Fig. 3.

Glukosegehalt der Lösung 5 Proz.
Apfelsäuregehalt 2 „

L	p_H gefunden	p_H berechnet
0,019	3,04	3,06
0,037	3,40	3,55
0,054	3,80	4,02
0,069	4,11	4,42
0,097	4,78	5,20
0,110	5,07	5,60

Wie man sieht, zeigt die glukosehaltige Apfelsäurelösung dasselbe Verhalten wie der Apfelsaft. Die berechnete Konzentration der Wasserstoffionen ist stets kleiner als die gefundene.

Es ist bekannt, daß sich der Säurecharakter einer Säure durch Zusatz von Nichtelektrolyten verändern läßt. Wir haben diese Erscheinung im allgemeinen Teil schon behandelt und verweisen deshalb auf den betreffenden Abschnitt (S. 8).

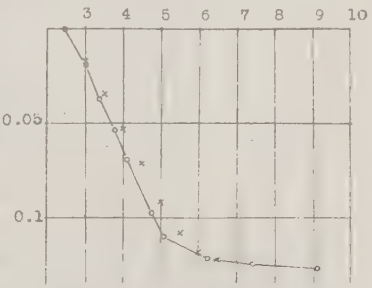


Fig. 3. Mischung von 5 Proz. Glukose, 2 Proz. Apfelsäure.
o gefundene Werte, × berechnete Werte.

Die Veränderung des Dissoziationsgrades der Elektrolyte ist aber nicht die einzige Wirkung der Glukose in einem Puffergemisch. Die Glukose selbst zeigt bei alkalischer Reaktion sehr starke Pufferwirkung (von p_H 9 weg) und vermag beträchtliche Mengen Lauge zu binden.

Bestimmt man nämlich die Laugenkapazität des Apfelsaftes, so findet man sie um das Mehrfache größer, als durch den Gehalt an freier Säure bedingt ist. Im Kurvenbild gibt sich dies dadurch zu erkennen, daß die Kurve sich zwischen p_H 11 und 12 steil aufrichtet. Würde ein reines Säure-Salzgemisch vorliegen, so dürfte dies erst nach p_H 12 stattfinden.

Nun kommen für die Pflanze hauptsächlich zwei Körperklassen in Betracht, welche bei so stark alkalischer Reaktion noch Pufferwirkung zeigen, die Zucker- und die Aminosäuren. Hier handelt es sich sehr wahrscheinlich um die Wirkung des Zuckers.

Wir haben Versuche angestellt mit Glukose und Saccharose. Die folgenden Tabellen sowie Fig. 4 geben Aufschluß darüber:

Titration von Glukoselösungen.

L	p_H der Glukoselösungen mit einem Gehalt von				
	0 Proz.	0,3 Proz.	1,2 Proz.	4,5 Proz.	12 Proz.
0,005	11,30	10,98	10,88	10,29	9,98
0,010	12,00	11,42	11,21	10,60	10,30
0,019	12,28	11,77	11,60	10,89	10,63
0,028	12,45	—	11,82	11,08	—
0,037	12,57	12,10	11,96	—	10,91
0,061	12,79	12,39	12,22	11,46	11,18
0,103	13,01	12,58	12,54	11,73	11,47
0,157	13,18	12,80	12,74	12,01	11,73

Titration von Saccharoselösungen.

L	0 Proz.	5 Proz.	10 Proz.
0,005	11,30	10,97	10,62
0,010	12,00	11,31	10,93
0,009	12,28	11,60	11,32
0,037	12,57	11,91	11,62
0,053	12,73	12,10	11,80
0,083	12,92	12,24	—
0,121	13,08	12,42	—
0,171	13,23	12,54	—

Wie man aus den Tabellen und Figuren ersieht, haben die Lösungen eine ganz beträchtliche Laugenkapazität, d. h. um einer Glukoselösung dasselbe p_H zu erteilen wie reinem Wasser, ist eine viel größere Menge Lauge notwendig. Die Kapazität ist so groß, daß sie sich aus meinen Versuchen nur für die niederen Konzentrationen angenähert bestimmen läßt. Bei einer 0,3prozentigen Glukoselösung ist sie sicher größer als 0,1, bei einer 12prozentigen schätzungsweise 0,6 bis 1,0. Um eine Vorstellung von der starken Pufferwirkung zu geben, sind in der folgenden Tabelle die Laugenmengen einander gegenübergestellt, die nötig sind, um den Glukoselösungen verschiedener Konzentration das p_H 12 zu erteilen.

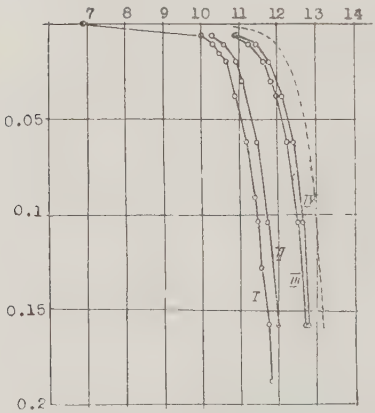


Fig. 4. Glukoselösungen
I. 12 Proz. Glukose,
II. 4,5 „ „
III. 1,2 „ „
IV. 0,3 „ „
gestrichelte Kurve: Wasser.

Glukose	0 Proz.	0,01
	0,3 „	0,03
	1,2 „	0,04
	5 „	0,4 extrapoliert
	12 „	0,8—1,0 „

Die letzten Werte sind wahrscheinlich noch bedeutend höher. Es liegt in der Glukose- sowohl als in der Saccharoselösung ein Puffersystem von wesentlich anderem Charakter vor als das Säure-Salzgemisch. Die Abhängigkeit der Pufferung von der Konzentration der Puffersubstanz ist in beiden Fällen eine ganz verschiedene. Beim Säure-Salzgemisch ändert sich mit der Konzentration die Steilheit der Kurve, bei Glukose und Saccharose hingegen bleibt sie gleich oder nahezu gleich; die Kurven scheinen einfach parallel der Abszissenachse verschoben.

Welche chemischen Reaktionen bei diesem Puffersystem eine Rolle spielen, ist schwer zu sagen. Bekanntlich tritt bei alkalischer Reaktion eine Umwandlung der Glukose in andere Aldosen oder in Ketosen ein. Michaelis und Rona (1912) haben gezeigt, daß die Geschwindigkeit dieser Umwandlung direkt proportional der Konzentration der Hydroxylionen ist, und nehmen an, daß die Umwandlung über die Enolform vor sich geht, die für Fruktose, Glukose und Mannose dieselbe ist. Nun sind bekanntlich die Enole starke Säuren. Es wäre also sehr wohl möglich, daß die Lauge als Enolsalz gebunden wird. Diese Erklärung ist aber nicht auf die Saccharose übertragbar. (Siehe oben; allgemeiner Teil, S. 8.)

Die Titrationskurven des Apfelsaftes zeigen in ihrem alkalischen Teil dasselbe Verhalten wie die Zuckerlösungen, ein starkes Ansteigen zwischen p_H 11 und 12. Ein Schluß auf den Zuckergehalt des Saftes läßt sich freilich aus der Titrationskurve nicht ziehen. Die Lage des steilen Kurvenastes verschiebt sich wohl mit der Konzentration, der Zusammenhang ist aber nicht zu übersehen.

In der folgenden Tabelle sind die Titrationskurven eines Apfelsaftes und einer Apfelsäurelösung, beide gleich viel Säure enthaltend, einander gegenübergestellt.

a) Apfelsäure, 0,04 molar

b) Apfelsaft, freie Säure 0,04 molar.

L	p_H	
	a)	b)
0,083	11,58	8,90
0,090	11,94	10,18
0,097	12,11	10,64
0,100	12,58	11,03
0,132	12,46	11,43
0,143	12,52	(11,52)
0,171	12,69	(11,78)

Die eingeklammerten Werte sind interpoliert.

Der Einfluß des Zuckers auf ein Puffergemisch besteht also in jedem Falle darin, daß er seine Wasserstoffionenkonzentration erhöht; bei saurer Reaktion wahrscheinlich durch Verstärkung der Dissoziation der Säure, bei alkalischer durch Bindung der Lauge. Sicheres darüber wissen wir noch nicht.

Beim Saft unreifer Äpfel findet man in der Titrationskurve eine kleine, wenig ausgesprochene Steilheit (Wendepunkt) zwischen p_H 9

und 10. Es ist möglich, daß sie auf das Vorhandensein von Gerbstoffen zurückzuführen ist, welche bei alkalischer Reaktion gute Pufferwirkung zeigen.

Süße Äpfel.

Der Saft der süßen Äpfel unterscheidet sich vom Safte der sauren durch seinen außerordentlich niedrigen Gehalt an freier Säure. Es scheint, daß der Unterschied im Geschmack der beiden Sorten nicht in erster Linie auf verschiedenen Zuckergehalt, sondern auf den verschiedenen Säuregehalt zurückzuführen ist.

In der folgenden Tabelle ist das Ergebnis einer Titration zusammengestellt.

Preßsaft von unreifen süßen Äpfeln.

p_H des frischen Saftes	4,35
Freie Säureäquivalente	0,016
Gebundene Säureäquivalente	0,018
	$Q = 0,9$
Molare Konz. der ges. Säure	0,017

L	p_H	
	Saft	Wasser
0,005	5,13	11,70
0,010	7,85	12,00
0,019	9,67	12,28
0,028	10,55	12,45
0,037	10,91	12,57
0,045	11,09	12,65
0,053	11,24	12,72
0,069	11,44	12,84
0,083	11,55	12,91
0,121	11,89	13,08
0,188	12,11	13,27

Aus den Tabellen geht wieder deutlich der Einfluß der Zuckers hervor. Die Laugenkapazität ist sehr groß.

Der Säuregehalt sowie das Verhältnis der freien zu der gebundenen Säure ändert sich (soviel man aus den wenigen Titrationen ersehen kann) während der Reife nicht wesentlich.

Weintrauben.

Die Titration des Preßsaftes wurde in derselben Weise durchgeführt wie bei den Äpfeln.

Wegen der großen wirtschaftlichen Bedeutung der Weintrauben

liegen über ihre Chemie gute Untersuchungen vor. Uns interessiert vor allem eine Arbeit von Baragiola und Godet (1914), in welcher das Reifen der Trauben chemisch-analytisch untersucht wird.

Nach den Angaben dieser Autoren besteht die Säure der Weintrauben zur Hauptsache aus Weinsäure und Apfelsäure. Daneben kommen noch ganz geringe Mengen von Gerbsäure und Essigsäure vor, die aber für die Pufferung nicht in Betracht kommen. Dasselbe gilt von den Phosphaten.

Die Behandlung dieses Puffersystems ist etwas komplizierter, da es sich aus zwei Säuren zusammensetzt, die zudem beide zweibasisch sind. Folgende Größen sind uns bekannt:

1. das Verhältnis der gesamten Apfelsäure zur gesamten Weinsäure (durch chemische Analyse festgestellt). Ich habe seinen Wert den Tabellen von Baragiola und Godet entnommen;

2. die Wasserstoffionenkonzentration des Saftes;

3. die Zahl der freien Säureäquivalente (Abstand der Asymptote);

4. die Dissoziationskonstanten der Apfel- und Weinsäure.

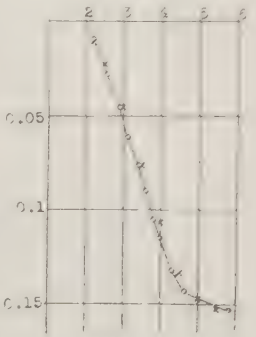


Fig. 5. Weinsäure.
× berechnete Werte,
o gefundene Werte.

Aus diesen Daten kann man die Verteilung der Kationen auf die einzelnen Neutralisationsstufen der Säuren ohne weiteres berechnen.

Zuerst wurde festgestellt, wieweit die empirisch gefundene Titrationskurve der Weinsäure mit der theoretischen übereinstimmt. Die folgende Tabelle gibt Aufschluß darüber. Siehe auch Fig. 5.

Titration einer Weinsäurelösung.

L	p_H gefunden	p_H berechnet
0,010	2,22	2,10
0,028	2,58	2,60
0,045	2,95	3,00
0,061	3,16	3,23
0,076	3,42	3,50
0,090	3,63	3,70
0,105	3,83	3,97
0,115	4,00	4,15
0,132	4,34	4,48
0,143	4,67	4,80
0,153	5,84	—
0,157	10,95	—

Wie man sieht, sind die gefundenen Werte den berechneten gegenüber etwas nach der sauren Seite hin verschoben. Der Grund kann vielleicht darin liegen, daß vom Agarheber, der mit Kaliumchlorid gesättigt ist, etwas Kaliumchlorid in die Lösung hineindiffundiert ist unter Ausfällung des schwerlöslichen sauren Salzes. Auf alle Fälle ist diese Fehlerquelle bei der Beurteilung der Titrationskurve zu berücksichtigen.

Die folgenden Tabellen veranschaulichen zwei Titrationen von Traubensaft.

Unreife Trauben, gepflückt am 9. September.

p_H des frischen Saftes	2,51
Freie Säureäquivalente	0,396
Gebundene Säureäquivalente	0,036
Verhältnis von Apfelsäure zu Weinsäure (nach Baragiola und Godet) etwa	1,5
Molare Konzentration der gesamten Säure	0,216
Apfelsäure	0,126
Weinsäure	0,090

Apfelsäure $Q = 19,4$
Weinsäure $Q = 6,4$

L	p_H gefunden	p_H berechnet
0,010	2,71	—
0,028	3,06	3,05
0,045	3,31	3,31
0,061	3,60	3,50
0,083	3,79	3,79
0,115	4,39	4,25
0,143	4,90	4,72
0,166	5,14	5,18

Reife Weintrauben, gelagert.

p_H des frischen Saftes	2,89
Freie Säureäquivalente	0,143
Gebundene Säureäquivalente	0,029
Molare Konzentration der gesamten Säure	0,086
Apfelsäure	0,049
Weinsäure	0,037

Apfelsäure $Q = 8{,}3$
Weinsäure $Q = 3{,}0$

L	p_H gefunden	p_H berechnet
0,005	3,13	3,10
0,010	3,25	3,26
0,019	3,48	3,50
0,028	3,70	3,85
0,037	3,94	4,15
0,053	4,48	4,83
0,069	5,54	(4,75)
0,075	8 40	—

Wie man sieht, ist die Übereinstimmung in der ersten Tabelle eine gute, in der zweiten ist die empirische Kurve der berechneten gegenüber nach der sauren Seite verschoben. Man könnte dies auch wieder auf den Zucker zurückführen. Tatsächlich enthält der Saft der unreifen Trauben viel weniger Zucker als der Saft der reifen. Ich möchte aber keinen allzugroßen Wert auf diese Erklärung legen, weil der oben erwähnte Fehler durch das Kaliumchlorid des Agarhebers im selben Sinne wirkt.

Überdies sind die berechneten Werte insofern unsicher, als das Verhältnis in den Säften nicht bestimmt, sondern einfach den Angaben der Literatur entsprechend eingesetzt worden ist. Es zeigt sich allerdings, daß eine Änderung dieses Verhältnisses keinen großen Einfluß auf den Verlauf der Kurven hat.

Zitronen.

Von allen Früchten weisen die Zitronen den größten Säuregehalt auf. Die Normalität der freien Säure beträgt 1,2. Da nur ein sehr geringer Teil der Säure in gebundener Form vorhanden ist, ist auch die Wasserstoffionenkonzentration sehr hoch. Das p_H des frischen Saftes beträgt 2,04.

Wie bei allen Früchten sind auch hier die gefundenen Werte des p_H saurer als die berechneten. Ob der Zuckergehalt der Zitrone genügt, um die beobachtete Verschiebung hervorzubringen (etwa 2 Proz.), oder ob in der Frucht eventuell noch andere Körper vorhanden sind, die ähnlich wirken, lassen wir dahingestellt. Daß der Zucker einen Einfluß hat auf die Dissoziation der Zitronensäure, habe ich nachgewiesen durch Titration des käuflichen „Sirupus citri", welcher Zitronensäure in konzentrierter Saccharose gelöst enthält. Es zeigt sich genau dasselbe wie bei der Apfel- und Weinsäure: Die Zitronensäure scheint in der zucker-

haltigen Lösung eine viel stärkere Säure zu sein als in rein wässeriger, wie schon Löffler und Spiro (1919) gezeigt haben. Die folgende Tabelle sowie Fig. 6 veranschaulichen eine Titration von Zitronensaft.

Titration von Zitronensaft.

Azidität des frischen Saftes 2,04
Freie Säureäquivalente 1,2
$Q = 33$

L	P_H gefunden	P_H berechnet
0,010	2,28	—
0,019	2,34	2,25
0,037	2,48	2,50
0,054	2,60	2,67
0,083	2,79	2,97
0,109	2,91	3,15
0,132	3,06	3,30
0,157	3,21	3,50

Tomaten.

Von allen bisher besprochenen Früchten unterscheiden sich die Tomaten dadurch, daß bei ihnen der größere Teil der Säure in gebundener Form vorhanden ist. Die Säure der Tomaten setzt sich aus Zitronensäure und Apfelsäure zusammen. Die folgende Tabelle gibt Aufschluß über die Verteilung der Basen auf die verschiedenen Neutralisationsstufen. Die Titrationskurve ist in Fig. 6 dargestellt.

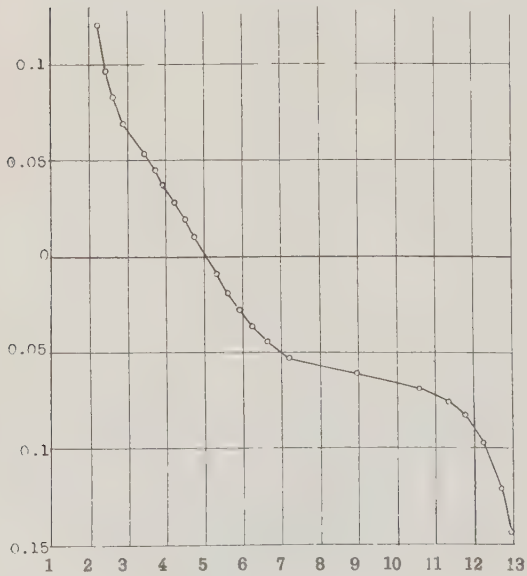


Fig. 6. Tomaten.

Zitronensäure
freie Säure 8 Proz.
primäres Salz 63 „
sekundäres Salz 28 „
tertiäres Salz 1 „

Apfelsäure
freie Säure 20 Proz.
primäres Salz 73 „
sekundäres Salz 7 „

Die Angabe von Borntraeger (1925), wonach die Tomaten gar keine freie Säure enthalten, ist also nicht richtig.

Anmerkung.

Man findet in der Literatur oft, daß bei der rechnerischen Behandlung von Puffergemischen die mehrbasischen Säuren einfach als einbasische betrachtet werden, in der Annahme, daß bei saurer Reaktion die Säuren nur in Form ihrer primären Salze vorhanden seien. Das geht im allgemeinen an, wenn die Dissoziationskonstanten der Säuren weit auseinanderliegen und zudem nur ein kleiner Teil derselben in gebundener Form vorliegt. Andernfalls führt diese Annahme zu falschen Werten. In dieser Beziehung sind z. B. die Berechnungen von v. d. Heide und Baragiola (1910) fehlerhaft. Die Autoren suchen im Wein- und Traubensaft das Verhältnis von freier und gebundener Säure festzustellen, betrachten aber Weinsäure und Apfelsäure als einbasisch. Um zu zeigen, wie groß die Abweichungen sind, stellen wir einige ihrer Werte den richtigen gegenüber. Die Tabelle gibt die Werte des Verhältnisses Q für die verschiedenen Säuren.

Enkirchner Wein.

	a)	b)
Weinsäure	1,14	1,99
Apfelsäure	0,21	0,23
Bernsteinsäure	0,045	0,043
Essigsäure	0,018	0,017
Milchsäure	0,72	0,70

Die Werte der Kolonne a) sind die von v. d. Heide und Baragiola angegebenen.

Allgemeines.

Bei allen untersuchten Früchten ist das Puffersystem ein Säure-Salzgemisch. Daß auch die Zucker als Puffer wirken können, hat biologisch keine Bedeutung, denn sie entfalten ihre Wirkung erst bei stark alkalischer Reaktion.

Es bleibt vor allem zu erörtern, welche Kationen für die Bindung der organischen Säuren vor allem in Frage kommen.

Wir nehmen als Spezialfall das Kalzium vorweg, das in vielen Pflanzen in kristallisierter Form an Oxalsäure gebunden massenhaft vorkommt. Die alte Streitfrage, ob das Kalzium dazu dient, die Oxalsäure, oder umgekehrt die Oxalsäure dazu dient, das Kalzium zu entgiften, soll hier nicht angeschnitten werden. (Siehe dazu Stahl 1920

und Benecke 1903). Es soll mit der obigen Bemerkung nur gesagt sein, daß, rein physikalisch-chemisch betrachtet, die an sich schwache Pufferwirkung der Oxalsäure dadurch verstärkt wird, daß das Ca-Salz ausfällt. Im allgemeinen sind im Verhältnis zu anderen Kationen die Pflanzenzellen eher arm an Kalzium, und zudem scheint es hauptsächlich in der Membran lokalisiert zu sein. (Pektinsaurer Kalk.) Das Magnesium dürfte bei der Neutralisation der organischen Säuren eine Rolle spielen, wo es in größerer Menge vorhanden ist. Das Vorkommen der übrigen Erdalkalien hat für die Pufferung keine allgemeine Bedeutung, so interessant auch im einzelnen ihr Vorkommen sein mag.

Es bleiben noch Natrium und Kalium.

Das Natrium macht gewöhnlich nur einen geringen Teil der Aschenbestandteile der Pflanze aus (wenige Prozent). Eine Ausnahme machen nur die typischen Salzpflanzen, bei denen es dann allerdings in Form des Kochsalzes in beträchtlichen Mengen vorkommen kann. Für die Pufferung hat es auch in diesem Falle nichts zu bedeuten, denn als Chlorid ist es zur Neutralisation organischer Säuren wertlos.

Am wichtigsten ist das Kalium. Es macht in den meisten Pflanzen und den meisten Organen einen großen Teil der Reinasche aus (30 bis 50 Proz.). Wir müssen also annehmen, daß die organischen Säuren hauptsächlich an das Kalium gebunden sind.

Zur Neutralisation der organischen Säuren besitzt die Pflanze einen beträchtlichen Überschuß der Kationen über die anorganischen Anionen. Die folgenden Zusammenstellungen, die den Wolffschen Tabellen entnommen sind, zeigen dies deutlich. Die Zahlen geben nur die Verhältnisse der Äquivalente zueinander. Die Phosphorsäure ist als einbasische Säure in Rechnung gezogen.

Apfel, Fruchtfleisch.

K	Na	Ca	Mg	H_3PO_4	H_2SO_4	HCl
0,65	0,67	0,15	0,44	0,12	0,15	0

Summe der Kationen	1,91
Summe der Anionen	0,37
Überschuß der Kationen	1,54

Prunus domestica, Frucht.

	K	Na	Ca	Mg	H_3PO_4	H_2SO_4	HCl
Haut	1,07	0,09	0,29	0,46	0,12	0,05	—
Fleisch	0,99	0,23	0,17	0,23	0,16	0,08	0,01
Kern	0,48	0,06	0,30	0,82	0,31	0,18	0,01

	Haut	Fleisch	Kern
Summe der Kationen	1,92	1,62	1,66
Summe der Anionen	0,17	0,25	0,50
Überschuß der Kationen	1,75	1,37	1,16

Urtica dioica.

	K	Na	Ca	Mg	H_3PO_4	H_2SO_4	HCl
Stengel	0,88	0,07	0,71	0,29	0,05	0,15	0,28
Blatt	0,28	0,05	0,30	0,42	0,10	0,26	0,09

	Stengel	Blatt
Summe der Kationen	1,90	2,05
Summe der Anionen	0,48	0,45
Überschuß der Kationen	1,42	1,60

Es schließen sich hier einige interessante Fragen an, welche die Aufnahme der Kationen in die Pflanze betreffen. Es ist klar, daß auch der Überschuß der Kationen in Form irgendwelcher anorganischer Salze aufgenommen werden muß. Es kommen dafür in Betracht: Sulfate, Nitrate, Phosphate, Chloride und Karbonate.

Am besten scheinen die letzteren zur Aufnahme von Alkalien geeignet zu sein, denn die Kohlensäure ist so schwach, daß sie bei der Azidität der Früchte sofort durch die viel stärkeren organischen Säuren ersetzt werden könnte. Es fragt sich nun, inwieweit Karbonate bei der Azidität der verschiedenen Böden beständig sind. Nach Wiegner und Geßner (1926) schwankt das p_H der Böden zwischen den Werten 4 und 8. Nach denselben Autoren beträgt der Partialdruck der Kohlensäure in der Bodenluft etwa 0,003 Atm. Aus diesen Angaben berechnet sich die höchstmögliche Karbonatkonzentration für die verschiedenen Werte des p_H der Böden wie folgt:

p_H	4	5	6	7	8
	0,00004	0,0004	0,004	0,037	0,37 g $KHCO_3$/l

Man sieht also, daß in sauren Böden nur Spuren von Karbonaten enthalten sein können.

Die Pflanze besitzt nun freilich die Fähigkeit, Stoffe anzureichern, die in der Nährflüssigkeit nur in sehr geringer Konzentration vorhanden sind. Man denke an den Jodreichtum gewisser Algen. Ob indessen eine solche Aufnahme der Karbonate stattfindet, ist sehr fraglich. Die Wasserkulturen haben gezeigt, daß die Pflanzen sehr wohl ohne Karbonate gedeihen können. Man vermeidet es sogar, den Nährlösungen solche beizufügen, weil sie dieselben viel zu stark alkalisch machen.

Nun sind aber die anderen Anionen sämtlich stark elektronegativ; soll also Alkali frei werden zur Bindung der schwachen organischen Säuren, so muß das Anion der Mineralsäure zerstört werden. Schon aus dieser Überlegung erhellt, daß Chloride für die Pufferung der Pflanze wertlos sind, denn meines Wissens bleiben sie in der Pflanze als solche erhalten. Das Alkali aber, das durch Salzsäure gebunden ist, kann durch keine andere Säure in Anspruch genommen werden.

Es bleiben also übrig Sulfate, Phosphate und Nitrate. Die Differenz von Kationen und Anionen ist zum größten Teil auf Rechnung der letzteren zu setzen. Nun spielen aber die anorganischen Stickstoffverbindungen in der Pflanze nur eine geringe Rolle. Die größte Menge des Stickstoffs ist in Form organischer Verbindungen vorhanden. Das Ion NO_3'' wird also in der Pflanze umgebaut, und die damit verbundenen Alkalien werden zur Bindung der organischen Säuren frei. Ähnliches gilt für die Phosphate. Sie gehen in der Pflanze meist esterartige Verbindungen ein (Phytin, Lecithin, Nukleinsäure). Versuche mit Pflanzen in Wasserkultur lehren, daß die Pflanzen diese beiden Anionen durchaus nötig haben und sie rasch und in großer Menge aufnehmen, wenn sie dieselben einige Zeit entbehrt haben.

Bei der Aufnahme der Ionen spielen nun die selektiven Fähigkeiten der Pflanze eine große Rolle, wie z. B. die Erscheinung der „physiologisch sauren" und „physiologisch alkalischen" Salze lehrt. Bekanntlich vermag eine Pflanze eine Lösung von Ammoniumsulfat anzusäuern, indem sie das Ammoniak unter Zurücklassung der Schwefelsäure herausnimmt. Die Nitrate dagegen wirken (mit Ausnahme des Ammoniumnitrats) in Nährlösungen umgekehrt. Sie sind physiologisch alkalisch, d. h. die Pflanze holt sich die Salpetersäure heraus und läßt das Alkali zurück. Es zeigt sich, daß überhaupt die Pflanze die Ionen, die sie braucht, sich nach Belieben aus der Lösung herausliest.

Dafür sind außer den eben genannten noch zahlreiche andere Beispiele bekannt. Baumann und Gully (1910) z. B. und im Anschluß an sie Wieler (1912) beobachteten, daß die Membranen (auch toter Pflanzen) die Fähigkeit besitzen, aus Lösungen von Neutralsalzen die Kationen herauszunehmen und dadurch die Lösung anzusäuern. Wieler erklärt die Erscheinung rein physikalisch-chemisch durch den negativ elektrischen Charakter der Kolloide der Zellmembranen. Redfern (1922) stellte fest, daß Keimlinge von Mais aus der Nährlösung das Kalzium herausnehmen und an seiner Stelle Kalium und Magnesium in die Lösung abgeben, daß also ein Austausch von Kationen

stattfindet. Pantanelli (1915) konnte zeigen, daß von den meisten Salzen die beiden Ionen mit verschiedener Intensität aufgenommen werden, und zwar aus Kalisalzen meistens das Kation, aus Nitraten das Anion.

Die Aufnahme der Nitrate hat als für die Pflanze die doppelte Bedeutung des Stickstoffgewinnes einerseits und der Versorgung mit nutzbaren Alkalien anderseits. Mit der Stickstoffaufnahme gekoppelt ist die Versorgung der Pflanze mit basischen Valenzen.

Bekanntlich kann man das gegenseitige Verhältnis von Säuren und Basen in der Pflanze von zwei entgegengesetzten Standpunkten aus betrachten. Einerseits kann man annehmen, daß der Überschuß der Kationen über die anorganischen Anionen als Schutz gegen die organischen Säuren dient, anderseits aber, daß die Säuren den Sinn haben, den Kationenüberschuß, der durch Aufnahme insbesondere der Nitrate entsteht, unschädlich zu machen. Nach der obigen Darstellung könnte es scheinen, als ob ich mich auf den ersten Standpunkt gestellt habe. Um Mißverständnissen vorzubeugen, muß ich auf die Frage noch kurz zu sprechen kommen.

Die gegebene Darstellung hat durchaus nicht den Sinn, die Notwendigkeit (im Sinne teleologischer Betrachtung) des Kationenüberschusses darzutun. Sie geht einfach von der Tatsache aus, daß ein solcher Überschuß wirklich existiert, und findet den Grund dazu in der Aufnahme von Salzen mit assimilierbarem Anion. Geht man dagegen umgekehrt von der Aufnahme dieser Salze aus, so wird man dazu geführt, die Entstehung des Kationenüberschusses als Nebenerscheinung anzusehen, und nach dem Mittel suchen, mit welchem die Pflanze den Überschuß basischer Valenzen kompensiert. Man findet dieses Mittel in der Säurebildung.

Ich glaube, daß man sich hier nicht extrem auf den einen oder andern Standpunkt stellen kann. Bei der tatsächlich beobachteten Häufigkeit der Säuren im pflanzlichen Stoffwechsel muß ein gewisser Kationenüberschuß durchaus notwendig erscheinen; anderseits ist aber die Produktion saurer Körper ebenso nötig, wenn man beachtet, daß durch die Assimilation des Nitratstickstoffs beständig basische Valenzen frei werden. Es ist zwar erwiesen, daß vermehrte Zufuhr von Kalzium eine Mehrproduktion von Oxalsäure hervorruft, daß also in diesem Falle tatsächlich das Kation regulatorisch auf die Produktion der Säure einwirkt. (Stahl, Benecke, loc. cit.) Wir können aber im allgemeinen nicht angeben, ob das Zuviel auf seiten des Anions oder des Kations liegt.

Es gehen hier zwei Vorgänge in vollkommener Harmonie nebeneinander her, ohne daß wir vorläufig wissen, wie sie zusammenhängen.

Endlich muß für die Neutralisation der Säuren auch das Ammoniak in Betracht gezogen werden. Bekanntlich können anstatt der Nitrate auch Ammoniumsalze der Pflanze als Stickstoffquelle dienen. Doch scheint es, daß im großen und ganzen die ersteren geeigneter sind. Es entsteht nun die Frage, in welcher Form das Ammoniak in die Pflanze eintritt. Zwei Fälle sind denkbar: Es tritt in Form eines Salzes ein oder es wird als freie Base aufgenommen.

Bei der Aufnahme als Salz wird ein anorganisches Anion mit aufgenommen. Bei der weiteren Verarbeitung des Ammoniaks zu Aminosäuren, Amiden usw. wird dasselbe frei und nimmt dem Organismus Alkali weg, falls es nicht selbst weiter verarbeitet wird. In Wasserkulturen wird das Ammoniak gewöhnlich als Sulfat geboten. Es sind nun zahlreiche Angaben vorhanden über Mißerfolge und schlechte Entwicklung der Pflanzen in derartigen Kulturen. Es ist nun sehr wohl möglich, daß in allen diesen Fällen eine allzustarke Ansäuerung der Pflanze durch das Sulfation stattgefunden hat. Daß eine derartige Ansäuerung stattfinden kann, nimmt auch Benecke an (Jost-Benecke, Vorl. über Pflanzenphysiologie, I, 245), denn das Stickstoffbedürfnis der Pflanze ist auf alle Fälle ein viel größeres als das Bedürfnis nach Schwefel. Daher wird die Überführung des Schwefels in organische Form nicht Schritt halten können mit der Assimilation des Stickstoffs.

Die gegenteilige Wirkung findet statt, wenn das Ammoniak als Base aufgenommen wird. In diesem Falle wird es offenbar zuerst, wenn auch nur intermediär, an eine organische Säure gebunden, denn die anorganischen Anionen sind beim großen Alkaliüberschuß der pflanzlichen Gewebe durch die stärkeren Basen abgesättigt. Daß eine solche selektive Aufnahme der Base tatsächlich stattfindet, wird sehr wahrscheinlich gemacht durch die eben erwähnte Tatsache der physiologischen Azidität der Ammoniumsalze. (Pantanelli, Prianischnikow, 1927, 1902.)

Zusammenfassend können wir also sagen, daß es für die Pufferung der Pflanze von großer Wichtigkeit ist, in welcher Form sie die Kationen aufnimmt. Mit anderen Worten, die Fähigkeit der Pflanze, aus einer gegebenen Lösung gewisse Ionen herauszulesen, ist auch für die Regelung des Säure-Basen-Gleichgewichts von großer Bedeutung. Die Pflanze muß sich gewissermaßen hüten, in größeren Mengen solche Anionen aufzunehmen, die sie nicht weiter verarbeiten kann und die ihr die wertvollen Alkalien binden. Die Tatsache, daß das Chlor für die

höheren Pflanzen ein entbehrliches Element ist, mag vielleicht damit zusammenhängen. Für die Pufferung der Pflanze ist dasjenige Kation das wertvollste, welches an ein Anion gebunden ist, das sie verarbeiten kann.

Das Ammoniak ist unter den basischen Verbindungen der Pflanze weitaus die wichtigste. Als leicht flüchtige und durch ihre stark basischen Eigenschaften giftige Verbindung kann es aber nicht als solches gespeichert werden. Ammoniakspeicher sind die im Pflanzenreich außerordentlich verbreiteten Säureamide Asparagin und Glutamin. Wir kommen auf diese Bindung des Ammoniaks später noch zu sprechen.

Es bleibt nun noch die wichtige Frage nach der Bedeutung der großen Säureanhäufung in den Früchten zu erörtern. Eine Zusammenstellung der älteren Literatur findet man bei Warburg (1886). Die neuere ist zusammengestellt bei Czapek, Biochemie der Pflanzen, III, pag. 100ff., ferner bei Kostytschew (1924).

Über die Pflanzensäuren existiert eine reiche Literatur; doch wissen wir über ihre Bedeutung im Stoffwechsel noch recht wenig Sicheres. Sowohl über die Art ihrer Entstehung als auch über ihre Verwendung im Stoffwechsel sind verschiedene Ansichten geäußert worden. Nun muß aber berücksichtigt werden, daß durchaus nicht jedes Vorkommen gleich zu bewerten ist, sondern daß den einzelnen Säuren ganz verschiedene Bedeutung zukommen kann.

Die Entstehung der Säuren ist prinzipiell auf zwei Wegen möglich, dem Wege der Oxydation oder dem Wege der Reduktion. Die älteren Forscher, vor allem Liebig (1862), waren geneigt, die Säuren, insbesondere die Oxalsäure als direkte Reduktionsstufen der Kohlensäure auf dem Wege zum Kohlehydrat anzusehen. Diese Annahme dürfte heute kaum mehr allgemein anerkannt werden. Das erste Assimilationsprodukt, das wir als solches erkennen, ist das fertige Kohlehydrat. Wir wissen nur, daß der Quotient $CO_2 : O_2$ beim Assimilationsvorgang den Wert 1 hat, daß also die Assimilation nach der Bruttoformel erfolgt $6\,CO_2 + 6\,H_2O = C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$. Welche Zwischenprodukte dabei aber auftreten und welcher Art die chemischen Reaktionen sind, die schließlich zum Kohlehydrat führen, wissen wir nicht, sondern können höchstens Vermutungen aussprechen. Wir können auf die verschiedenen Hypothesen hier nicht eingehen (siehe dazu Schröder 1917), sondern erwähnen nur einen Befund, der in diesem Zusammenhang von Interesse ist. Bassalik (1916) fand, daß bei Rumex eine starke Anhäufung von Oxalsäure stattfindet, wenn man diePflanze belichtet, und daß umgekehrt die Oxalsäure bei Verdunkelung abnimmt. Man könnte annehmen, daß hier die Oxalsäure erstes Assimilations-

produkt ist; doch müßte man erst den Quotienten CO_2/O_2 und ferner den Kohlehydratstoffwechsel der Pflanze kennen, um etwas Sicheres darüber aussagen zu können.

In vielen Fällen können wir mit ziemlicher Sicherheit eine Entstehung der Säuren durch Oxydation annehmen. Das gilt vor allem für die heterotrophen niederen Organismen, denen als Kohlenstoffquellen hochmolekulare organische Verbindungen, wie Zucker oder Eiweiß, dargeboten werden. Es ist wohl das einfachste, anzunehmen, daß ohne weitere Umwege Säuren oxydiert werden, eventuell nachdem sie zu einfacheren und leicht diffundiblen Verbindungen übergeführt worden sind. (Hydrolyse usw.) Auch bei vielen höheren Pflanzen ist die Entstehung der Säuren durch Oxydation sehr wahrscheinlich. Man kann z. B. bei Sukkulenten durch Abschluß des Sauerstoffs die Säurebildung aufheben. (Warburg 1886.) Damit soll aber durchaus nicht gesagt sein, daß die Säuren überhaupt nicht durch reduktive Prozesse entstehen könnten. Voraussetzung dazu ist natürlich, daß die zur Reduktion nötige Energiemenge zur Verfügung steht. Es scheint, daß in der Natur diese Energie gewöhnlich durch oxydative Prozesse geliefert wird, die neben den reduktiven herlaufen, und daß die Cannizzarosche Dismutation einer der verbreitetsten biologischen Prozesse ist, d. h. daß Oxydo-Reduktionen ubiquitär sind. Das Studium z. B. der Gärungserscheinungen durch Neuberg (1923) hat dafür Beispiele geliefert. Außer der Reduktion der Kohlensäure im Assimilationsprozeß sind in der Pflanzenphysiologie verschiedene reduktive Vorgänge bekannt. Wir erinnern an die Pilze, die mit organischen Säuren als Kohlenstoffquellen gut gedeihen und Kohlehydrate bilden. Kostytschew (1920) hat die Entstehung von Zucker oder Alkohol aus d-Weinsäure, Milchsäure, Chinasäure, Glyzerin bei Ausschluß von Sauerstoff beobachtet. Diese Stoffe müssen notwendig reduziert werden, wenn sie in Kohlehydrate oder Aminosäuren übergehen sollen. Darauf fußend hat schon Warburg betont, daß auch bei höheren Pflanzen die Regeneration der organischen Säuren zu Kohlehydraten sehr wohl möglich sei.

Es fragt sich nun, welches Material bei der Bildung der Säuren oxydiert wird. Hiefür kommen sowohl Kohlehydrate, als auch Fette, als auch Eiweißstoffe in Betracht. Es ist aber im einzelnen Falle recht schwierig, zu entscheiden, aus welcher der drei genannten Stoffklassen die Säuren hervorgehen. Auch bei den heterotrophen niederen Organismen, die man auf ganz bestimmten organischen Kohlenstoffquellen (Glukose, Pepton) kultiviert, steht durchaus nicht fest, daß sie die Säuren direkt aus dem dargebotenen Material bilden. Mazé (1904, 1908)

vertrat die Ansicht, daß bei Citromyces, der auf Zucker kultiviert wird, die Zitronensäure nicht direkt aus dem letzteren, sondern aus den Eiweißstoffen des Pilzes gebildet wird. Butkewitsch (1925) allerdings bezweifelt diese Annahme. Wenn die Zitronensäure aus dem Eiweiß des Pilzes gebildet wird, so sollte sie bei beliebiger Kohlenstoffquelle auftreten. Das ist aber durchaus nicht der Fall; auf Pepton z. B. wird an ihrer Stelle reichlich Oxalsäure gebildet. Der Autor schließt daraus, daß der Zucker direkt abgebaut wird. Immerhin ist die Möglichkeit, daß Kohlehydrate erst in Proteine übergeführt und diese erst oxydiert werden, nicht außer acht zu lassen.

Noch weniger abgeklärt ist die Frage bei den höheren Pflanzen. Die älteren Forscher (Warburg 1886), ferner auch Czapek (Biochemie der Pflanzen) waren am ehesten geneigt, als Ausgangsmaterial Kohlehydrate anzunehmen. Warburg betont jedoch ausdrücklich, daß die Säuren durchaus nicht aus Zucker zu entstehen brauchen, wenn auch ein enger Zusammenhang zwischen Säure- und Zuckergehalt bei vielen Pflanzen festgestellt worden ist. Neuerdings nimmt Kostytschew (1924) an, daß die Säuren im wesentlichen von Aminosäuren oder Amiden abzuleiten sind (Asparagin, Glutamin); er faßt sie also als Nebenprodukt des Eiweißstoffwechsels auf.

In den Früchten ist die Entstehung aus Kohlehydraten wohl die wahrscheinlichere. Es müßte, wenn die Säuren tatsächlich aus den genannten stickstoffhaltigen Körpern hervorgehen würden, unter gewissen Bedingungen eine Anreicherung der letzteren zu erzielen sein. Das ist aber meines Wissens nie beobachtet worden.

Hingegen findet man bei Sukkulenten Amide in großer Menge. (Glutamin bei Mesembryanthemum, siehe unten.) Es ist daher in diesen Fällen sehr wohl ein Zusammenhang zwischen Eiweißstoffwechsel und Säurestoffwechsel möglich.

Es handelt sich nun darum, eine genauere Vorstellung über den Mechanismus dieser Oxydation zu gewinnen.

Gehen wir von der Glukose aus, so gelangen wir von einer Kohlenstoffverbindung mit 6 C-Atomen zu einer solchen mit vier; Oxydationsprodukte mit 5 C-Atomen sind in der Natur nicht nachgewiesen. Der Abbau derart, daß ein Kohlenstoffatom nach dem andern wegoxydiert wird, ist wenig wahrscheinlich.

K. Spiro (1921) hat darauf aufmerksam gemacht, daß ein enger Zusammenhang besteht zwischen dem aus den chemischen und physikalischen Konstanten erkennbaren paarigen Aufbau der Fettsäuren und deren Oxydation. Zahlreiche Beobachtungen über den Abbau der

Fettsäuren im Tierkörper haben gezeigt, daß immer ein paariger Abbau stattfindet, d. h. daß die Kette zwischen α- und β-Atom gesprengt wird. Nur in ganz vereinzelten Fällen kann die Oxydation am α-Atom erfolgen, z. B. bei der Propionsäure, was aber bestritten wird (Knoop).

Es fragt sich nun: welche Verbindungen bei der Oxydation der Glukose zuerst entstehen. Die Tierphysiologie gibt zahlreiche Beispiele dafür, daß bei der β-Oxydation mit besonderer Vorliebe Keto- und Aldehydverbindungen entstehen.

So nimmt Neuberg an, daß bei der Oxydation des Glykogens zu Milchsäure als erste Stufe das Methylglyoxal gebildet wird.

Ferner haben Neubauer (1908), Flatow (1910) und andere gezeigt, daß der erste Abbau der Aminosäuren oxydativ ist und zu Ketonsäuren führt (nicht etwa zu einer Hydroxylverbindung durch Hydrolyse). Sie wurden vor allem zu dieser Ansicht geführt durch das Studium der Abbauprodukte im Harn bei Verfütterung von Aminosäuren. Flatow (1910) fand z. B. nach Darreichung von m-Tyrosin die m-Oxyphenylbrenztraubensäure. C. Neuberg wies nach, daß bei der Gärung Brenztraubensäure und Azetaldehyd gebildet wird. Es scheint also, daß bei den natürlichen Oxydationen vor allem die reaktionsfähigen Aldehyd- und Ketoverbindungen entstehen. Wir werden daher per analogiam zur Annahme geführt, daß auch die ersten Oxydationsstufen der Glukose nicht Oxy-, sondern Keton- oder Aldehydsäuren sind.

Nehmen wir dies nun an und berücksichtigen wir ferner den paarigen Abbau, so könnte als erste Oxydationsstufe der Glukose die Glyoxylsäure in Betracht kommen.

$$C_6H_{12}O_6 + 3\,O_2 = 3\,C_2H_2O_3 + 3\,H_2O.$$

Aus ihr können nun ohne weiteren Energieaufwand die übrigen Pflanzensäuren gewonnen werden; es zeigt sich im Gegenteil, daß die Vorgänge alle unter äußerer Wärmetönung verlaufen.

1. Apfelsäure.

$$3\,C_2H_2O_3 = C_4H_6O_5 + 2\,CO_2$$

Verbrennungswärme von	3 Molekülen	Glyoxylsäure	376 cal
„	„ 1 Molekül	Apfelsäure	320 „
		Differenz	+ 56 cal

2. Weinsäure.

$$5\,C_2H_2O_3 = 2\,C_4H_6O_6 + 2\,CO_2$$

Verbrennungswärme von	5 Molekülen	Glyoxylsäure	627 cal
„	„ 2 „	Weinsäure	554 „
		Differenz	+ 73 cal

3. Zitronensäure.

$$4\,C_2H_2O_3 = C_6H_8O_7 + 2\,CO_2 + H_2O$$

Verbrennungswärme von	4 Molekülen Glyoxylsäure	502 cal
„	1 Molekül Zitronensäure	475 „
	Differenz	+ 27 cal

Die Oxalsäure geht aus der Glyoxylsäure durch eine einfache Oxydation hervor.

Diese Reaktionen werden eintreten, wenn nur wenig Sauerstoff zugegen ist. Ist dieser hingegen reichlich vorhanden, so kann die vollständige Verbrennung der Glyoxylsäure zu Kohlensäure und Wasser erfolgen.

$$C_2H_2O_3 + O_2 = 2\,CO_2 + H_2O$$

Über das Vorkommen der Glyoxylsäure bei den Pflanzen finden sich verschiedene Angaben. (Literatur siehe bei Czapek, Biochemie der Pflanzen.) Sie soll vorkommen in unreifen Beeren der Weintrauben und Stachelbeeren, ebenso in den Blättern derselben Pflanzen, ferner in den Beeren von Vaccinium Oxycoccos sowie im Safte der Zuckerrübe. Der Einwand, der gegen die Annahme der Glyoxylsäure als erste Oxydationsstufe daraus erhoben werden könnte, daß sie nirgends in größerer Menge vorkommt, ist nicht stichhaltig, denn es ist möglich, daß sie im Momente ihrer Entstehung sich zu den Pflanzensäuren kondensiert. Wie wir gezeigt haben, verlaufen diese Kondensationen unter äußerer Wärmetönung. Man darf daher wohl annehmen, daß sie unter gewissen Bedingungen sehr leicht vonstatten gehen.

Daß aus Glyoxylsäure eventuell die übrigen Pflanzensäuren entstehen könnten, haben schon Chuard und Brunner (1886) vermutet. Sie weisen ihr aber eine ganz andere Stellung im Stoffwechsel an als wir, indem sie annehmen, daß sie eine Reduktionsstufe der Kohlensäure beim Assimilationsprozeß ist. Wir können in eine Kritik dieser Auffassung hier nicht eingehen. Es sei nur folgendes bemerkt: Das Auffinden einer Verbindung im Organismus läßt durchaus noch nicht erkennen, ob sie durch Synthese oder durch Abbau entstanden ist. Wir werden noch mehrmals die Gelegenheit haben, darauf hinzuweisen, daß die Natur bei Aufbau und Abbau ähnliche oder dieselben Wege einschlägt; Knoop (1926) hat neuerdings auf die Bedeutung dieser Reversibilität der biochemischen Vorgänge hingewiesen.

Wenn wir also in den Blättern Glyoxylsäure (oder Formaldehyd) finden, so ist damit noch nicht bewiesen, daß diese Verbindungen durch Reduktion entstanden sind. Aus Untersuchungen Spoehrs (1913) geht

hervor, daß sie ebensogut durch Abbau von Oxysäuren unter dem Einfluß des Lichtes entstehen können. Nach dem, was ich soeben über die Umkehrbarkeit der biologischen Prozesse bemerkt habe, kann man freilich mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen, daß ein Körper, der als Abbauprodukt nachgewiesen ist, auch beim Aufbau entstehen kann.

Es ist den Tierphysiologen eine bekannte Tatsache, daß im Tierkörper hauptsächlich Fettsäuren mit gerader Anzahl der Kohlenstoffatome vorkommen. Dasselbe gilt auch für die Pflanzensäuren:

Glyoxylsäure	2	C-Atome	Bernsteinsäure	4	C-Atome
Oxalsäure	2	,,	Fumarsäure	4	,,
Glykolsäure	2	,,	Zitronensäure	6	,,
Milchsäure	3	,,	Akonitsäure	6	,,
Apfelsäure	4	,,	Chelidonsäure	7	,,
Weinsäure	4	,,			

Mustert man die Reihe der höheren Fettsäuren, welche in der Pflanze vorkommen, so findet man auch hier vorherrschend solche mit paarer Anzahl der C-Atome. (Siehe Czapek, Biochemie der Pflanzen.)

Die oben angeführten Beispiele mit 3 und 7 Atomen, Milchsäure und Chelidonsäure, spielen eine ganz untergeordnete Rolle. Es scheint also, daß der Pflanze die Synthese der paaren Kohlenstoffverbindungen besonders leicht gemacht ist, eine Feststellung, die mit der Annahme der Glyoxylsäure als Baustein der übrigen Pflanzensäuren sehr wohl verträglich ist.

An dieser Stelle muß aber nachdrücklich darauf hingewiesen werden, daß nun gerade für die Glukose und die übrigen Hexosen die Regel des paarigen Abbaues in vielen Fällen nicht gilt. Zahlreiche Erfahrungen weisen darauf hin, daß sie sehr leicht in zwei C_3-Gruppen zerfällt. Evans und andere (1927) beziehen die Entstehung von Milchsäure bei Behandlung mit Alkalien auf die Formulierung, Nefs, der in alkalischer Lösung neben andern eine Modifikation mit Doppelbindung zwischen dem dritten und vierten C-Atom annimmt (3,4-Endiol). Vor allem hat die Biochemie Tatsachen aufgedeckt, welche auf eine enge Verwandtschaft zwischen 3atomigen Kohlenstoffketten und Hexosen hinweisen. Es sei hier nur erinnert an die Bildung von Milchsäure aus Glykogen in den Muskeln oder aus Glukose bei der Milchsäuregärung. Diese Umwandlung ist reversibel. (Embden und andere 1913, Dakin und Dudley 1913.) Ferner kann Alanin in Zucker übergehen.

Nun spielt allerdings, wie schon erwähnt, bei den höheren Pflanzen die Milchsäure lange nicht die große Rolle wie im Tierkörper. Bei der Verbreitung der Hexosen und ihrer Polymerisationsprodukte in der

Pflanze müßte sie aber sicher in größerer Menge auftreten, wenn ihr Abbau auf ähnliche Weise vor sich gehen würde wie im Tierkörper. Es ist also sehr wohl möglich, daß hier die Oxydation nach einem anderen Modus stattfindet, etwa durch Angriff am β-Atom, wie oben angenommen wurde.

Die Glyoxylsäure braucht nicht notwendig aus Kohlehydraten zu entstehen; sie kann sich ebenso leicht aus Fetten und Aminosäuren, d. h. Eiweißkörpern herleiten. Nehmen wir wieder die β-Oxydation an, so erhalten wir für den Abbau der Fettsäuren das folgende Schema:

$$R \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH + 2\,O_2 \longrightarrow R \cdot CO \cdot CO \cdot COOH$$
$$R \cdot CO \cdot CO \cdot COOH + H_2O \longrightarrow R \cdot COOH + CHO \cdot COOH$$

Was die Entstehung aus Eiweißkörpern betrifft, so haben wir oben schon erwähnt, daß die Aminosäuren unter Ammoniakaustritt zu Ketosäuren oxydiert werden; aus denselben kann nach dem soeben gegebenen Schema wieder die Glyoxylsäure abgespalten werden.

Nehmen wir an, daß die genannten Oxydationen reversibel sind, so ist es möglich, daß aus der Glyoxylsäure sowohl Fette als auch Kohlehydrate, als auch Proteine entstehen können; mit anderen Worten: Die Glyoxylsäure wäre der Baustein, der diesen drei großen Körperklassen gemeinsam ist und über welchen sie ineinander übergeführt werden können.

Nun ist vor allem von Embden[1]) gezeigt worden, daß tatsächlich der tierische Organismus imstande ist, Ammoniumsalze von α-Ketonsäuren in die entsprechenden Aminosäuren überzuführen. Die Energie für diese Reduktionen wird offenbar von gleichzeitig stattfindenden Oxydationen geliefert. Es ist möglich, daß ähnliche Mechanismen vorliegen wie bei einer Cannizzaroschen Reaktion. Neuerdings ist es Knoop und Oesterlin (1925) gelungen, die Synthese von Aminosäuren aus Ammoniak und Ketosäuren unter physiologischen Bedingungen direkt durchzuführen (Reduktion mit Wasserstoff und Palladium als Katalysator). Siehe auch Knoop (1926). Sind nun auch die angegebenen Oxydationen von Kohlehydraten und höheren Fettsäuren reversibel, so ist sehr wohl denkbar, daß auch die Pflanzensäuren wieder zu Kohlehydraten reduziert werden können, wenn nur ein Prozeß nebenherläuft, der die nötige Energie liefert. Sehr wahrscheinlich werden die Säuren, die durch Kondensation aus der Glyoxylsäure entstanden sind, nicht direkt reduziert, sondern erst wieder in die letztere zurückverwandelt. Es scheint mir nun sehr plausibel, in diesem Falle die einfache Cannizzarrosche Oxydo-Reduktion anzunehmen: Der eine Teil der Glyoxyl-

[1]) Literatur siehe z. B. bei Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chem.

säure wird verbrannt, der andere z. B. zu Glukose reduziert, nach dem Schema:

$$6\ C_2H_2O_3 = C_6H_{12}O_6 + 6\ CO_2.$$

Durch die hier vorgetragene Auffassung erhält die Glyoxylsäure eine zentrale Stellung im Stoffwechsel der Pflanze. Wenn sie auch vorläufig hypothetisch ist und weit davon entfernt, durch sichere experimentelle Tatsachen gestützt zu sein, so zeigt sie uns doch einen möglichen Weg, auf dem die einzelnen Stoffklassen ineinander übergeführt werden können. Daß diese Umwandlung möglich ist und sowohl bei Tier als auch bei Pflanze beständig stattfindet, dürfte wohl als erwiesen gelten. Schon die alltägliche Erfahrung, daß unsere Nahrung Kohlehydrat, Fett und Eiweiß durchaus nicht in einem bestimmten Verhältnis zu enthalten braucht, sondern daß wir mit sehr einseitiger Nahrung auskommen, weist darauf hin, daß solche Umwandlungen vorkommen, vor allen Dingen aber auch die Erfahrung, daß wohl alle Stoffe über Kohlehydrate verbrannt werden, wenigstens bei der Muskelarbeit.

Nehmen wir z. B. die Fette, die in den Samen der Pflanzen in reichlicher Menge vorkommen können. Während der Keimung verschwinden sie und werden höchstwahrscheinlich in Kohlehydrat oder Eiweiß übergeführt. Über den chemischen Mechanismus dieser Überführung weiß man weiter nichts, als daß die Fette erst hydrolytisch gespalten werden. Es liegt nun sehr nahe, anzunehmen, daß die entstehenden Fettsäuren auf die oben angegebene Weise durch β-Oxydation abgebaut werden, so daß Glyoxylsäure entsteht. Wie wir gezeigt haben, kann diese ohne weiteres durch eine Cannizzarosche Reaktion in Glukose übergeführt werden. Auf ähnliche Weise läßt sich die Synthese der Aminosäuren und damit der Proteine denken.

In diesem Schema würden also die Pflanzensäuren gewissermaßen als Speicherungsform der Glyoxylsäure zu bezeichnen sein. Die Pflanze hält sich diese reaktionsfähige Verbindung in Form der stabileren Oxysäuren bereit.

Auf alle Fälle sind die Säuren ihrem chemischen Charakter nach Produkte einer unvollständigen Oxydation.

Warburg hat darauf aufmerksam gemacht, daß durch diese Auffassung auch ihr Vorkommen, vor allem auch ihre Anhäufung verständlich wird.

Sie finden sich überall dort, wo aus irgendeinem Grunde der Sauerstoffzutritt verhindert oder erschwert ist, also dort, wo sich große Gewebemassen mit wenig entwickeltem Interzellularsystem befinden, wie das bei vielen Früchten und bei den Blättern der Sukkulenten der

Fall ist. Begünstigt wird ferner die Säureanhäufung überall dort, wo ein reger Stoffwechsel herrscht (Assimilationstätigkeit, Anreicherung von Assimilaten), ohne daß gleichzeitig für entsprechende Sauerstoffzufuhr gesorgt ist. Das ist wiederum bei den Blättern der sukkulenten Pflanzen der Fall, ferner bei allen raschwachsenden Organen, zu denen eben auch die Früchte gehören. Auch Astruc (1901), der die Verteilung der Säuren in den verschiedenen Organen studiert hat, macht darauf aufmerksam, daß es immer die am stärksten wachsenden Teile der Pflanze sind, welche den größten Säuregehalt aufweisen. Er schließt daraus, daß ein direkter Zusammenhang bestehen müsse zwischen der Säurebildung und der Intensität des Wachstums.

Warburg bringt die Faktoren, die begünstigend auf Säurebildung oder Säureabbau wirken, in das folgende übersichtliche Schema:

Die Säureproduktion ist proportional

1. der Intensität des Stoffwechsels,
2. dem Schutze gegen Sauerstoffzutritt.

Der Säurekonsum ist proportional

1. der Intensität des Stoffwechsels,
2. der Zugänglichkeit für den atmosphärischen Sauerstoff,
3. der Temperatur.

Für die Früchte ist die Entstehung der Säuren aus Kohlehydraten am wahrscheinlichsten. Es ist auch nicht anzunehmen, daß ihr Vorkommen gerade hier eine besondere physiologische Bedeutung hat, sondern ich glaube, daß ein Zusammentreffen verschiedener Bedingungen ihre so reichliche Entstehung bedingt. In erster Linie sind es die histologischen Verhältnisse der Frucht, welche eine genügende Sauerstoffversorgung der Gewebe nicht zulassen, und in Verbindung damit ein intensiver Stoffwechsel, der durch das rasche Wachstum bedingt ist. Ein großer Teil der in der Frucht gebildeten Säuren geht ja verloren, wenn sie abfällt.

II. Sukkulente Pflanzen.

Ich habe die Titrationskurven des Saftes folgender Sukkulenten aufgenommen:

Sedum spez.,
Mesembryanthemum Bolusii,
Opuntia spez.,
Aloe arborescens.

In bezug auf die Säurebildung haben die Versuche nichts Neues ergeben. Sie bestätigen bloß die längst bekannte Tatsache, daß der Säuregehalt und die Azidität am Morgen und am Nachmittag verschieden sind.

Sie zeigen hingegen, daß die Methode der elektrometrischen Titration für dergleichen Untersuchungen sehr geeignet ist. Der große Vorteil gegenüber der gewöhnlichen Titration mit Indikatoren ist der, daß sie auch zu erkennen gestattet, wieviel gebundene Säure im Safte vorhanden ist.

Während bei den Früchten immer nur ein kleiner Teil der Säure in gebundener Form vorhanden ist, finden wir bei den übrigen Organen der Pflanze, besonders bei den Blättern, daß der größere Teil Säure als Salz vorhanden ist. Es sind also diese Organe viel reicher an Kationen als die Früchte. Das gibt sich schon in der Azidität ihrer Preßsäfte zu erkennen. Das p_H der meisten Früchte liegt zwischen 2 und 3, während es bei den Blättern stets die Werte 5 oder 6 hat. Folgende Tabelle zeigt dies.

Aspidistra		6,04
Aloe arborescens		4,81
Opuntia		4,89
Sedum	nachmittags	5,19
	morgens	4,28
Mesembryanthemum		5,14

Nehmen wir, wie angegeben wird, für Sedum Apfelsäure, für Mesembryanthemum Oxalsäure an, so ergibt sich die folgende Verteilung auf die verschiedenen Neutralisationsstufen:

Sedum:

	nachmittags	morgens
freie Säure	0 Proz.	6 Proz.
primäres Salz	7 „	35 „
sekundäres Salz	93 „	59 „
Q	0,04	0,3

Mesembryanthemum:

	belichtet	verdunkelt
freie Säure	0 Proz.	0 Proz.
primäres Salz	17 „	28 „
sekundäres Salz	83 „	72 „
Q	0,1	0,16
freie Säureäquivalente etwa	0,01	0,012
gebundene „ „	0,09	0,075

Das sind Konzentrationen der Kationen, wie man sie bei Früchten nie findet. Der große Gehalt der Blätter an Mineralstoffen gibt sich deutlich in ihrem hohen Aschengehalt zu erkennen. Die folgenden Zahlen sind den Wolffschen Tabellen entnommen.

Reinasche in Prozenten des Trockengewichtes:

Pyrus malus, Frucht	1,44
Prunus domestica	2,34
Primula farinosa	11,73
Urtica dioica	17,82

Im allgemeinen gilt über die Pufferung der sukkulenten Pflanzen dasselbe, was über die Früchte gesagt worden ist.

Von besonderem Interesse ist Mesembryanthemum. Im Zellsaft dieser Pflanze kommt nämlich in großer Menge das Glutamin vor. Bei der Titration mit Lauge zeigt der ansteigende Ast der Kurve keinen einfachen Verlauf, sondern besitzt bei p_H 10,5 einen Wendepunkt, der für die Aminosäuren charakteristisch ist. (Siehe Fig. 8.)

Die Aminosäuren sowie deren Amide sind typische Ampholyte, d. h. sie vermögen sowohl Säuren als auch Basen zu binden. Sie können daher mit beiden Puffergemische bilden. Der Säure- und Laugencharakter ist aber meist wenig ausgeprägt.

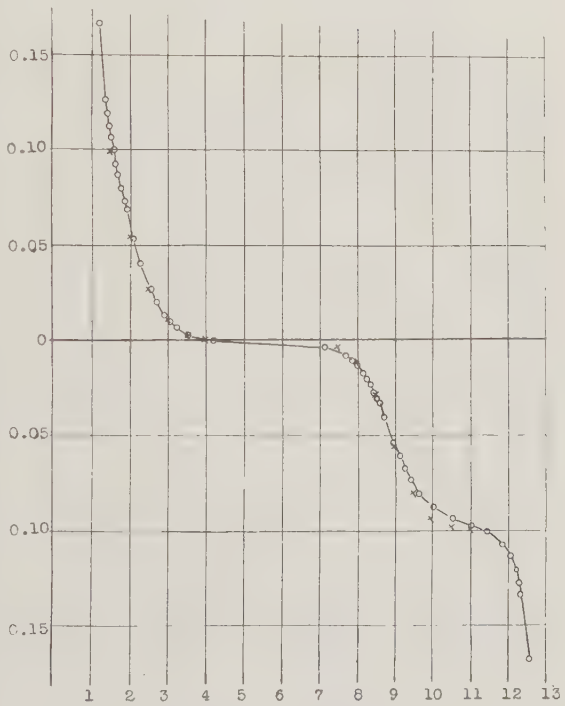


Fig. 7. $\frac{n}{10}$ Asparagin $+ \frac{n}{10}$ Na Cl.
o gefundene Werte, × berechnete Werte.

Man sollte erwarten, daß die Titrationskurve der Ampholyte sowohl bei der Titration mit Säure als auch bei der Titration mit Lauge einen „p_H-Sprung“ aufweist. Bei der Titration mit Lauge findet man tatsächlich einen solchen. Aber die Dissoziationskonstante der Säure ist gewöhnlich so klein, daß er nur wenig ausgeprägt ist. Immerhin kann man Glykokoll und Asparagin noch mit einiger Genauigkeit elektrometrisch titrieren. Das ist aber bei der Titration mit Säure meist nicht mehr der Fall. Die Dissoziations-

konstante der Base ist gewöhnlich so klein, daß kein deutlicher Neutralisationspunkt mehr vorhanden ist und man daher in der Titrationskurve einen gleichmäßig ansteigenden Ast erhält.

Als Beispiel diene die Titration einer n/10-Asparagin-Lösung.

Der besseren Leitfähigkeit wegen wurde die Lösung mit Kochsalz versetzt, ähnlich den Sörensenschen Glykokollgemischen (Konzentration ebenfalls n/10). Die durch den Laugenzusatz bedingte Verdünnung des Asparagins wurde nicht durch Asparaginzusatz ausgeglichen. Um die Kurve mit den übrigen ohne weiteres vergleichen zu können, sind deshalb die Ordinaten auf die anfängliche Asparaginkonzentration umgerechnet (siehe auch Fig. 7.)

Kolonne 1: ccm n-NaOH,
„ 2: L,
„ 3: L, auf die anfängliche Konzentration des Asparagins umgerechnet.
„ 4: p_H.

1	2	3	4	1	2	3	4
0,00	0,000	0,000	4,21	1,00	0,062	0,067	9,28
0,05	0,003	0,003	7,14	1,10	0,068	0,073	9,45
0,10	0,007	0,007	7,71	1,20	0,074	0,080	9,67
0,15	0,010	0,010	7,88	1,30	0,080	0,087	10,04
0,20	0,013	0,013	8,02	1,40	0,085	0,093	10,58
0,25	0,016	0,017	8,15	1,45	0,088	0,097	11,03
0,30	0,020	0,020	8,24	1,50	0,091	0,100	11,48
0,35	0,023	0,023	8,33	1,60	0,096	0,107	11,88
0,40	0,026	0,027	8,43	1,70	0,102	0,113	12,10
0,45	0,029	0,030	8,50	1,80	0,107	0,120	12,25
0,50	0,032	0,033	8,58	1,90	0,112	0,127	12,33
0,60	0,038	0,040	8,71	2,00	0,118	0,133	12,38
0,80	0,051	0,053	8,99	2,50	0,143	0,167	12,63
0,90	0,057	0,060	9,13				

Die Analyse der Titrationskurve eines Ampholyten geschieht am einfachsten, wenn man ihn bei der Titration mit Lauge als schwache Säure, bei der Titration mit Säure als schwache Basis auffaßt. Es gelten dann für die beiden einzelnen Teile dieselben Gesetze wie für ein Säure-Salz-Gemisch oder ein Basen-Salz-Gemisch. Die Lösung eines Ampholyten verhält sich wie eine Lösung, die gleichzeitig eine schwache Säure und eine schwache Base im freien Zustand und in gleicher Konzentration enthält. Die beiden Wendepunkte, die bestimmend sind für die beiden Dissoziationskonstanten, haben also dieselbe Ordinate. Kennt man also die Kon-

zentration des Ampholyten, d. h. ist der eine p_H-Sprung ausgeprägt, so kann man die beiden Dissoziationskonstanten angeben.

1: ccm n-HCl.

2: S.

3: S. auf die anfängliche Konzentration des Asparagins umgerechnet.

4: p_H.

1	2	3	4	1	2	3	4
0,00	0,000	0,000	4,22	1,10	0,068	0,073	1,84
0,05	0,003	0,003	3,51	1,20	0,074	0,080	1,77
0,10	0,007	0,007	3,24	1,30	0,080	0,087	1,68
0,15	0,010	0,010	3,04	1,40	0,085	0,093	1,62
0,20	0,013	0,013	2,92	1,50	0,091	0,100	1,58
0,30	0,020	0,020	2,70	1,60	0,096	0,107	1,50
0,40	0,026	0,027	2,56	1,70	0,102	0,113	1,45
0,60	0,038	0,040	2,30	1,80	0,107	0,120	1,41
0,80	0,051	0,053	2,09	1,90	0,112	0,127	1,36
1,00	0,062	0,067	1,92	2,50	0,143	0,167	1,20

Man findet in unserem Falle für die Abszissen der Wendepunkte die Werte 2,1 und 8,9. Die beiden Konstanten haben also die Werte:

Säurekonstante $1{,}3 \cdot 10^{-9}$

Basenkonstante $1{,}3 \cdot 10^{-12}$

Berechnet man mit Hilfe dieser Werte die Kurve und vergleicht sie mit der gefundenen, so findet man gute Übereinstimmung, wie die Fig. 11 zeigt.

Titriert man den Preßsaft von Mesembryanthemum, so findet man eine Kurve von demselben Typus. Die folgende Tabelle und Fig. 8 veranschaulichen eine solche Titration.

Preßsaft aus den Blättern von Mesembryanthemum.
Pflanze vor dem Versuch verdunkelt.

L	p_H	L	p_H
0,000	4,78	0,097	10,53
0,005	5,40	0,103	10,57
0,010	6,38	0,115	10,66
0,015	8,07	0,127	10,73
0,019	8,79	0,148	11,10
0,028	9,60	0,162	11,54
0,037	9,98	0,171	11,84
0,054	10,26	0,179	12,06
Wendepunkt		0,195	12,28
0,083	10,45		

Der Wendepunkt liegt etwa bei 10,4. Es handelt sich wahrscheinlich nicht um das Asparagin, sondern um einen andern ähnlichen Körper. Es liegt nahe, an das nächst höhere Homologe des Asparagins, das Glutamin zu denken. Eine genauere Untersuchung zeigte, daß es sich höchstwahrscheinlich um diesen Körper handelt.

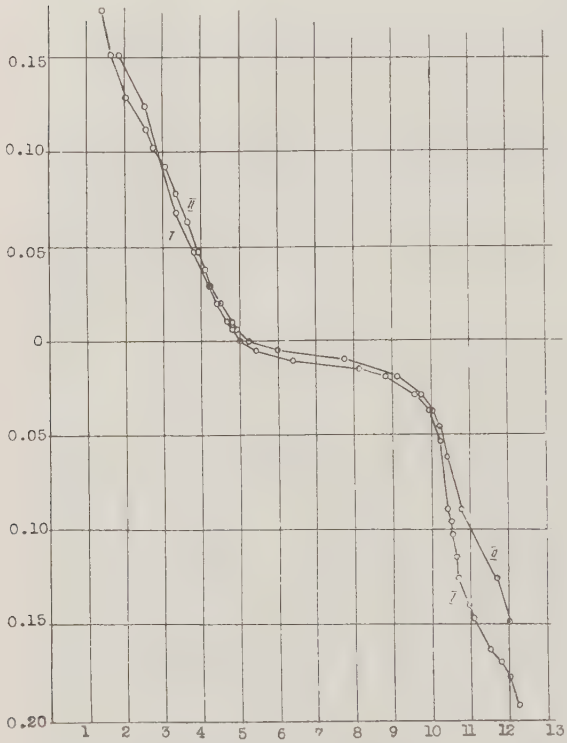


Fig. 8. Mesembryanthemum.
I verdunkelt, II belichtet.

Sowohl Asparagin als auch Glutamin lassen sich gut mit $Hg[NO_3]_2$ fällen (Schulze 1882). Erst wurden im Saft die organischen Säuren mit Bleiacetat gefällt und sodann die konzentrierte Lösung des Quecksilbersalzes zugesetzt, bis sich kein Niederschlag mehr bildete. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, ausgewaschen, mit Schwefelwasserstoffgas zerlegt und das Filtrat im Brutschrank bei 37° eingeengt. Es kristallisierte ein Körper in langen feinen Nadeln aus, wie sie für das Glutamin charakteristisch sind. Der sichere Nachweis soll an Hand eines größeren Materials noch erbracht werden.

In der Literatur ließ sich keine Angabe über das Vorkommen des Glutamins bei Mesembryanthemum finden.

Glutamin und Asparagin gehören zu den interessantesten Verbindungen der Pflanze. Besonders das letztere ist schon seit langem der Gegenstand eingehender Untersuchungen. Das biochemische Verhalten des Glutamins ist weniger gut bekannt, doch dürfte es im Stoffwechsel eine ähnliche Rolle spielen wie das Asparagin.

Das Asparagin ist bekanntlich das Amid der Asparaginsäure, hat also die Konstitution

$$\begin{array}{l} CONH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CHNH_2 \\ | \\ COOH \end{array}$$

Man charakterisiert seine Stellung im Stoffwechsel wohl am besten, wenn man es als den Ammoniakspeicher der Pflanze bezeichnet. Das Ammoniak in der Pflanze kann zweierlei Ursprung haben. Einmal kann es von außen in Form von Ammoniumsalzen oder in geringer Konzentration als freie Base aufgenommen werden, zweitens entsteht es in der Pflanze selbst durch den Abbau der Aminosäuren. Wir kommen darauf noch zu sprechen.

Man war sich über die Entstehung des Asparagins lange Zeit nicht im klaren und war geneigt, dasselbe als direktes Spaltungsprodukt der Eiweißkörper anzusehen. Heute steht fest, daß das nicht richtig ist, sondern daß die Pflanze das Asparagin synthetisch aus Ammoniak und stickstofffreien Kohlenstoffverbindungen aufbaut. Nach einer Bemerkung Czapeks (Biochemie der Pflanzen) kann man zwar annehmen, daß die Asparaginsäure schon im Eiweißmolekül als Amid vorhanden ist. Die geringe Menge der Asparaginsäure im pflanzlichen Eiweiß (1—5,5 Proz.) aber, im Gegensatz zu der großen Menge des freien Amids (bis 25 Proz. des Trockengewichtes bei Lupinenkeimlingen), machen die Annahme einer Synthese durchaus notwendig. Ganz abgesehen hiervon, gibt es zahlreiche biologische Beobachtungen, welche für eine Synthese des Asparagins und einen engen Zusammenhang seiner Entstehung mit dem Kohlehydratstoffwechsel der Pflanze sprechen.

Die Asparaginbildung ist abhängig vom Gehalt der Pflanze an Kohlehydraten. Smirnow (1923) weist nach, daß Pflanzen, die von Natur aus reich sind an Kohlehydraten, den Stickstoff vor allem in Form von Amidstickstoff speichern (Gerstenkeimlinge). Umgekehrt speichern kohlehydratarme ihn hauptsächlich als Ammoniakstickstoff. Durch Darreichung von Glukose kann man auch in diesem Falle eine Vermehrung des Aminostickstoffes bewirken. Auch Butkewitsch (1909, 1912) konnte zeigen, daß bei Mangel an Kohlehydraten kein Asparagin gebildet, dafür aber Ammoniak angereichert wird.

Man kann ferner die Asparaginbildung durch Abschluß des Sauerstoffs verhindern. Diese Tatsache kann freilich nur insofern als Beweis für die synthetische Bildung des Asparagins gelten, als die Ammoniakabspaltung aus den Aminosäuren tatsächlich ein oxydativer Vorgang ist. Diese Annahme hat aber durch zahlreiche Erfahrungen, insbesondere der Tierphysiologie (Neubauer, siehe oben) einen hohen Grad von Wahrscheinlichkeit erhalten[1]). Daß man Schlüsse, die sich auf Tatsachen aus der Tierphysiologie stützen, ohne weiteres auf die Pflanzen-

[1]) Kostytschew (1927, S. 70) weist in ähnlichem Zusammenhang auf ihre Bedeutung hin.

physiologie überträgt, hat jedenfalls eine gewisse Berechtigung, nachdem sich immer mehr die Gleichartigkeit der biochemischen Vorgänge bei Tier und Pflanze zeigt.

So wenig wir das Asparagin als direktes Spaltungsprodukt des Eiweißes ansehen dürfen, so wenig dürfen wir annehmen, daß es direkt zum Aufbau der Aminosäuren verwendet werden kann. Wir wissen über die Synthese der Proteine in der Pflanze noch recht wenig. Es scheint aber ganz allgemein, daß der Organismus beim Abbau und bei der Synthese seiner Verbindungen denselben Weg geht, nur in umgekehrter Richtung. Es scheint, daß er gewisse Nahtstellen der Verbindungen sowohl benützt, sie aufzubauen, als auch sie zu zertrümmern. Die oben behandelte β-Oxydation einerseits und das Vorherrschen der Verbindungen mit paariger Kohlenstoffkette im Organismus anderseits sind Beispiele dafür. Wenn also erwiesenermaßen das Asparagin nicht eine Stufe beim Abbau der Eiweißstoffe ist, so ist auch wenig wahrscheinlich, daß es direkt zu deren Synthese verwendet wird, d. h. daß sein Kohlenstoff direkt in die Kohlenstoffkette des Eiweißmoleküls übergeht. Auch hier muß man vor allem die geringe Menge der Asparaginsäure im Eiweiß im Gegensatz zur großen Menge des Asparagins als Grund anführen, daß das letztere nicht als solches zur Eiweißsynthese verwendet wird. Es ist der Pflanze in erster Linie um das Ammoniak und nicht um das Kohlenstoffgerüst des Asparagins zu tun; das erstere wird abgespalten und tritt mit stickstoffreien Körpern zu Aminosäuren zusammen, das letztere wird offenbar weitgehend umgebaut.

Es scheint vielmehr, daß das Asparagin der Typus einer Verbindung ist, die der Speicherung eines ganz bestimmten Stoffes dient, in diesem Falle des Ammoniaks. Seiner stark basischen Eigenschaften wegen ist dieses für die Pflanze ein starkes Gift, und muß deshalb in einer unschädlichen Form gespeichert werden. In geringer Menge finden sich bei den meisten Pflanzen Ammoniumsalze (Weevers 1916). Doch sind diese offenbar wenig dazu geeignet, Ammoniak in größerer Menge zu speichern. Anorganische Ammoniumsalze sind nicht wohl möglich, da die Anionen durch die stärkeren Basen abgesättigt sind, organische sind wegen der starken Hydrolyse zu wenig beständig und vor allem zu empfindlich gegen Reaktionsänderungen. In Form des Asparagins oder Glutamins dagegen ist das Ammoniak in einer Bindung enthalten, die selbst für starke Säuren und Alkalien unangreifbar ist. Es handelt sich bei der Bindung des Ammoniaks um eine Pufferwirkung, weil es dabei in eine Form von viel schwächeren basischen Eigenschaften übergeführt wird. Über den chemischen Mechanismus des Vorganges wissen wir nichts sicheres.

Wir dürfen offenbar die oben entwickelten Anschaunngen über die Synthese der Aminosäuren im Organismus auch auf diesen Fall übertragen und annehmen, daß es sich um einen reduktiven Vorgang handelt.

Smirnow (1923) nimmt an, daß die Synthese vom Ammoniumsalz einer Oxysäure ausgeht. Durch Abspaltung von Wasser entsteht erst das Amid. Durch Eintritt eines Moleküls Ammoniak unter nochmaliger Dehydrierung läßt er die Aminogruppe entstehen. Dieser letzte Schritt scheint mir wenig wahrscheinlich. Offenbar wird die Oxysäure zuerst zu einer Keto- oder Aldehydverbindung umgewandelt. Es liegt nahe, auch hier die Glyoxylsäure anzunehmen. Wir haben ja oben schon angenommen, daß die Oxysäuren nicht als solche in den Stoffwechsel weiter einbezogen werden, sondern daß die Umwandlungen immer über die Glyoxylsäure gehen.

Der tierische Organismus bildet eine Verbindung, die große Ähnlichkeit hat mit dem Asparagin, nämlich den Harnstoff. Schon 1864 hat Boussingault auf diese Analogie aufmerksam gemacht. Wie das Asparagin, so enthält auch der Harnstoff das Ammoniak in einer neutralen Form. Ein fundamentaler Unterschied besteht aber zwischen den beiden Körpern. Das Asparagin ist, wie wir soeben gesehen haben, ein intermediäres Produkt, das seinen Stickstoff dem Körper wieder zurückgeben muß. Der Harnstoff hingegen ist ein richtiges Exkret, das jedenfalls zum vorwiegenden Teile aus dem Organismus entfernt wird. Die Pflanze gibt den Stickstoff der abgebauten Eiweißkörper nicht nach außen ab, sondern verwendet ihn von neuem zur Synthese. Er wird erst nach ihrem Tode bei der Zersetzung ihres Körpers frei. Das Tier hingegen gibt den Stickstoff täglich in seinen Exkrementen ab. Das mag damit zusammenhängen, daß er für die Pflanze ein viel kostbareres Material darstellt als für das Tier. Sie muß ihn aus anorganischen Verbindungen erst in organische Form überführen, während das Tier ihn ausschließlich als vorgebildete organische Nahrung aufnimmt.

Es ist interessant, die Analogie zwischen Asparagin und Harnstoff auch nach der chemischen Seite etwas näher zu verfolgen.

Im Harnstoff sind die beiden Endprodukte des tierischen Stoffwechsels, Kohlensäure und Ammoniak, vereinigt. Man kann seine Synthese darstellen durch die Bruttoformel

$$2\,NH_3 + CO_2 = CO\,(NH_2)_2 + H_2O.$$

Auch das Asparagin enthält Kohlensäure und Ammoniak, aber in die Synthese ist ein Glukosemolekül einbezogen.

$$4\,NH_3 + 2\,CO_2 + C_6H_{12}O_6 = 2\,C_4H_8O_3N_2 + 4\,H_2O.$$

Die physiologische Verschiedenheit der beiden Verbindungen gibt sich in ihrem Aufbau aufs deutlichste zu erkennen. Der Harnstoff ist eine

Verbindung von sehr geringer chemischer Energie. Seine Abgabe bedeutet also für den Organismus keinen Verlust. Das Asparagin hingegen besitzt noch einen beträchtlichen kalorischen Wert.

Man kann die Verhältnisse auch noch von einer etwas anderen Seite betrachten. Vom Harnstoff gelangt man durch einfache Hydratation zu den beiden anorganischen Verbindungen zurück, aus denen die organische Welt ihren Stickstoff und ihren Kohlenstoff bezieht. Das Tier gibt somit der anorganischen Natur dieselben Verbindungen zurück, die es auf dem Umwege über die Pflanze von ihr erhalten hat. Der Harnstoff steht am Ende einer unendlichen Kette von Umwandlungen, die über äußerst komplizierte Gebilde führt, aber schließlich nur wieder einen Schritt von den beiden Anfangsgliedern entfernt stehen bleibt.

Auch das Asparagin steht am Ende einer solchen Kette. Man muß aber, von ihm ausgehend, noch einen viel weiteren Weg zurücklegen, um zur Kohlensäure und zum Ammoniak zurückzugelangen, wie die folgende Gleichung lehrt:

$$4\,NH_3 + 8\,CO_2 + 2\,H_2O = 2\,C_4H_8O_3N_2 + 6\,O_2.$$

Es bedarf dazu noch eines weitgehenden oxydativen Abbaues.

Die Säureamidgruppe ist im Harnstoff nur mit einem Amidrest verbunden, im Asparagin aber mit einem Alaninrest, welcher ja der wesentliche Bestandteil so vieler das Eiweiß aufbauender Aminosäuren ist (Phenylalanin, Thyrosin, Histidin, Tryptophan) und durch seine C_3-Gruppe die Beziehungen zur Glukose deutlich genug erkennen läßt. Man erkennt dies am besten aus der folgenden Formulierung:

$NH_2 \cdot CO - NH_2$ Harnstoff

$$NH_2 \cdot CO - \begin{array}{l} CH_2 \\ | \\ CHNH_2 \\ | \\ COOH \end{array}$$

Asparagin.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.

1. Die Titrationskurve einer Lösung sei gegeben durch die Gleichung $S = S(h)$, diejenige des Wassers durch $S_0 = S_0(h)$. S bedeutet die Zahl der pro Volumeneinheit zugefügten Säuremoleküle, S_0 die Zahl der Säuremoleküle, die man reinem Wasser zufügen muß, um dieselbe Wasserstoffionenkonzentration zu erreichen, wie in der Pufferlösung. Als Maß für die Pufferung nehmen wir den Ausdruck $\frac{d(S-S_0)}{dh}$ an.

Ein entsprechender Ausdruck gilt für Basen.

Es wird also für das reine Wasser die Pufferung identisch gleich Null gesetzt und die Pufferung irgendeiner Lösung wird wesentlich be-

stimmt durch die Abweichung ihrer Titrationskurve von derjenigen des Wassers.

2. Es wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß gewisse Lösungen bei Säurezusatz stärker sauer werden als Wasser, dadurch nämlich, daß sie Stoffe enthalten (Nichtelektrolyte, wie Glyzerin, Zucker, Alkohole), welche die Dissoziation der betreffenden Säuren zu erhöhen imstande sind. Dies führt auf den Begriff der „negativen" Pufferung.

3. Es werden Formeln hergeleitet, die erlauben, in einem Gemisch verschiedener mehrbasischer Säuren mit ihren Salzen die Verteilung der Basis auf die verschiedenen Neutralisationsstufen der einzelnen Säuren auf einfache Weise zu berechnen.

4. Die Titrationskurven der Preßsäfte einer Anzahl Früchte und einiger Sukkulenten zeigen, daß deren Pufferung fast ausschließlich den organischen Säuren zuzuschreiben ist. Die Kurven stimmen in erster Annäherung gut mit den theoretischen überein. Die Abweichungen sind sehr wahrscheinlich durch den Zuckergehalt der Früchte bedingt.

5. Es wurde deshalb der Einfluß von Glukose und Saccharose auf Puffergemische organischer Säuren (Apfelsäure, Weinsäure) untersucht. Der Zusatz dieser Zucker erhöht stets die Wasserstoffionenkonzentration des Gemisches; Lösungen von Glukose und Saccharose zeigen bei alkalischer Reaktion starke Pufferwirkung. Sie vermögen beträchtliche Mengen Lauge zu binden.

6. Die Untersuchung des Preßsaftes von Mesembryanthemum ergab, daß dieser große Mengen Glutamin enthält.

7. Die Bedeutung der organischen Säuren im Stoffwechsel wird diskutiert und insbesondere die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß sie aus Kohlehydraten oder höheren Fettsäuren durch Oxydation des β-Atoms entstehen. Als erstes Oxydationsprodukt kann dabei die Glyoxylsäure entstehen.

Literatur.

Astruc 1901, Compt. rend. **133,** 491.
Auerbach u. Smolczyk 1924, Zeitschr. f. physik. Chem. **110,** 65.
Baragiola u. Godet 1914, Landw. Jahrb. **1914,** 249.
Bassalik 1916, Bull. Ac. des sciences de Cracovie (classe des sc. math. et nat. série B) **1916,** 203.
Baumann u. Gully 1910, Mittlg. d. bayr. Moorkulturanstalt **4,** 31.
Benecke 1903, Bot. Ztg. **61,** 79.
Bornträger 1925, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genußmittel **50,** 273.
Boussingault 1864, Compt. rend. **58,** 917.
Brunner u. Chuard 1886, Ber. d. chem. Ges. **19,** 595.
Butkewitsch 1909, Biochem. Zeitschr. **16,** 411.
— 1912, Biochem. Zeitschr. **41,** 431.

Butkewitsch 1925, Jahrb. f. wiss. Bot. **64,** 637.
Czapek, Biochemie der Pflanzen.
Dakin and Dudley 1913, Journ. of Biol. Chem. **15,** 127.
Eder u. Kutter 1926, Helv. Chim. Acta. **9,** 355.
Embden (Schmitz, Kondo, Fellner) 1910, Biochem. Zeitschr. **29,** 423.
— 1912, Biochem. Zeitschr. **38,** 393, 407, 414.
— 1913, Hoppe-Seyler **88,** 210.
Flatow 1910, Hoppe-Seyler **64,** 367.
Franzen u. Ostertag 1922, Hoppe-Seyler **122,** 263.
Hastings and van Slyke 1922, Journ. of Biol. Chem. **53,** 269.
v. d. Heide u. Baragiola 1910, Landw. Jahrb. **1910,** 1021.
Hofmeister 1901, Die Organisation der Zelle.
— 1914, Zeitschr. f. Morph. und Anthrop. **18,** 717.
Knoop und Oesterlin 1925, Hoppe-Seyler **148,** 294.
— 1926, Münch. med. Wochenschr. **73,** 2151.
Kostytschew 1920, Hoppe-Seyler **111,** 236.
— 1924, Die Pflanzenatmung.
Koppel u. Spiro 1914, Biochem. Zeitschr. **65,** 409.
Kylin 1914, Jahrb. f. wiss. Bot. **53,** 465.
Liebig 1862, Die Chemie u. ihre Anwendungen auf Agrikultur u. Physiologie, I, 197.
Loeffler u. Spiro 1919, Helv. Chim. Acta **2,** 417, 533.
Mazé 1904, Annales Inst. Pasteur **18,** 553.
— 1909, **23,** 830.
Michaelis 1922, Die Wasserstoffionenkonzentration.
— 1925, The effects of ions in colloidal systems.
— u. Rona 1912, Biochem. Zeitschr. **47,** 447.
Moser 1926, Helv. Chim. Acta **9,** 414.
Neubauer 1908, Habilitationsschrift
Neuberg 1923, Ergebn. der Physiol. **21,** 404.
Pantanelli 1915, Jahrb. f wiss. Bot. **56,** 689.
Prianischnikow 1902, Versuchst. **56,** 107.
— 1927, Biochem. Zeitschr. **182,** 204.
Redfern 1922, Annals of Bot. **36,** 167.
Schröder 1917, Hypothesen über die chemischen Vorgänge bei den Kohlensäureassimilationen.
Schulze 1882, Ber. d. chem Ges. **15,** 2855.
van Slyke 1922, Journ. of Biol. Chem. **52,** 525.
Smirnow 1923, Biochem. Zeitschr. **137,** 1.
Sörenesen 1909, Biochem. Zeitschr. **21,** 131.
Spiro 1921, Helv. Chim. Acta **4,** 459.
— 1922, Klin. Wochenschr. **1,** 1199.
Spoehr 1913, Biochem. Zeitschr. **57,** 95.
Stahl 1920, Flora **113,** 1.
Täufel u. Wagner 1926, Biochem. Zeitschr. **177,** 389.
Ucko u. Bansi 1927, Hoppe-Seyler **164,** 52.
Ursprung u. Blum 1921, Ber. d. bot. Ges. **39,** 76.
Warburg 1886, Unters. d. bot. Inst. Tübingen **2,** 53.
Weevers 1916, Rec. trav. bot. Néerl. **13,** 63.
Wieler 1912, Ber. d. bot. Ges. **30,** 394.
Wiegner u. Geßner 1926, Koll.-Zeitschr. **40,** 209.
Willstätter u. Stoll 1918, Unters. über die Assimilation der Kohlensäure.
— Waldschmidt-Leitz u. Memmen 1923, Hoppe-Seyler **125,** 23.
— u. Waldschmidt-Leitz 1924, Hoppe-Seyler **134,** 161.

Curriculum vitae.

Ich, Franz Leuthardt aus Arlesheim (Kt. Baselland), bin geboren am 13. September 1903 in Liestal als Sohn des Dr. F. Leuthardt, Rektor der Bezirksschule Liestal, und der Anna geb. Schneider.

Ich besuchte die obere Realschule in Basel vom Frühjahr 1918 bis Herbst 1921 und wurde daselbst mit dem Reifezeugnis entlassen.

Im Oktober 1921 wurde ich an der math.-nat. Abteilung der philosophischen Fakultät der Universität immatrikuliert.

Seit August 1926 habe ich die Stelle eines Assistenten an der physiologisch-chemischen Anstalt der Universität inne.

Ich habe die Vorlesungen und Kurse der folgenden Herren Professoren und Dozenten besucht:

Buxtorf, Fichter, Gardiner, Handschin, Häberlin, Hagenbach, Mohrmann, Matthies, Portmann, Reinhard, Rupe, Saunders, Senn, Schüepp, Speiser, Spieß, Spiro, Weiß, Witschi, Zschokke.

Die vorliegende Arbeit ist entstanden unter der Leitung der Herren Prof. Spiro und Senn. Allen meinen Lehrern, insbesondere den beiden letztgenannten, sei an dieser Stelle der herzlichste Dank ausgesprochen.

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde an der physiologisch-chemischen Anstalt der Universität ausgeführt.